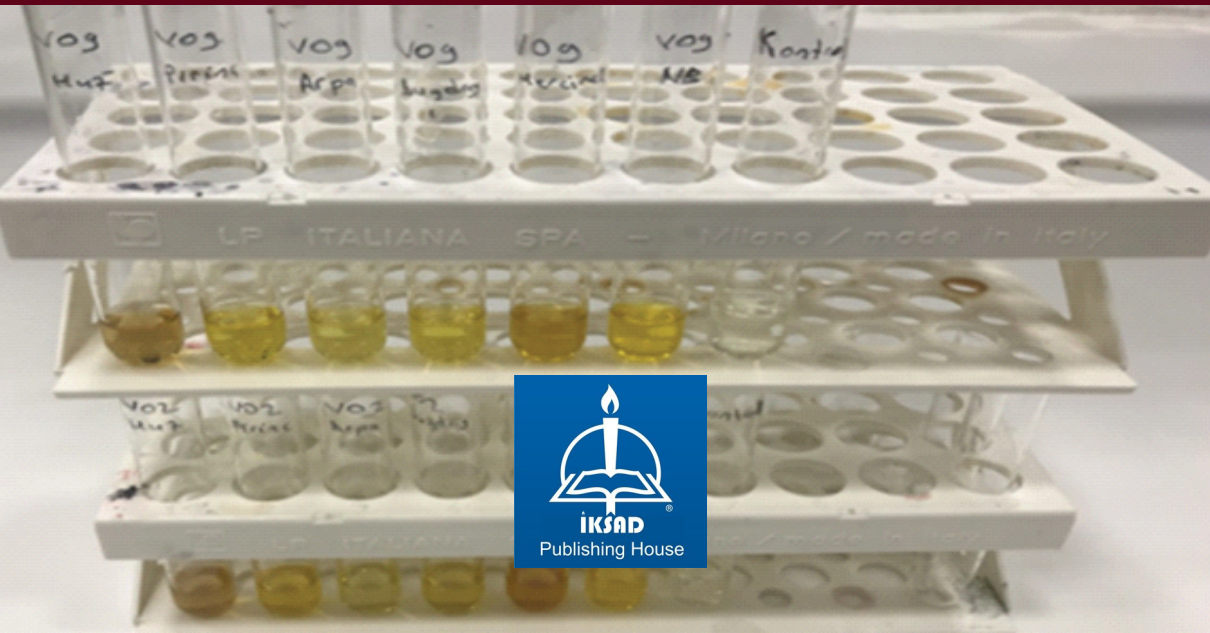


β -Galaktosidaz Enziminin Katı Faz Fermantasyon Yöntemiyle Üretimi

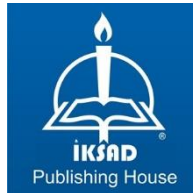
Bilim Uzmanı Erkan YILMAZ
Dr. Veysi OKUMUŞ



β -Galaktosidaz Enziminin Katı Faz Fermantasyon Yöntemiyle Üretimi

Bilim Uzmanı Erkan YILMAZ
Dr. Veysi OKUMUŞ

DOI: <https://dx.doi.org/10.5281/zenodo.14579498>



Copyright © 2024 by iksad publishing house
All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, distributed or
transmitted in any form or by
any means, including photocopying, recording or other electronic or mechanical
methods, without the prior written permission of the publisher, except in the case of
brief quotations embodied in critical reviews and certain other noncommercial uses
permitted by copyright law. Institution of Economic Development and Social
Researches Publications®

(The Licence Number of Publicator: 2014/31220)

TURKEY TR: +90 342 606 06 75

USA: +1 631 685 0 853

E mail: iksadyayinevi@gmail.com

www.iksadyayinevi.com

It is responsibility of the author to abide by the publishing ethics rules.

Iksad Publications – 2024©

ISBN: 978-625-378-139-2

Cover Design: İbrahim KAYA

December / 2024

Ankara / Türkiye

Size = 16x24 cm

ÖNSÖZ

β -galaktosidaz enzimi, süt şekeri olarak da bilinen laktozun hidrolizini katalizleyerek laktoza göre daha tatlı ve çözünürlüğü yüksek olan glikoz ve galaktoz monosakkaritlerinin oluşumunu sağlar. Çözünürlüğü düşük olan laktozun sindirim problemlerine bağlı olarak kalın bağırsakta birikmesi sonucunda laktoz intoleransı görülür. Ortamda biriken fazla laktoz molekülleri ozmotik etkiye neden olarak dokunun susuz kalmasına, dokularda çok az miktarda kalsiyum emilmesine ve mikrofloranın laktoz fermantasyonu neticesinde sulu ishal, şişkinlik, gaz, karın ağrısı, bulantı ve kusmaya bağlı şikayetler şeklinde kendini gösteren rahatsızlıklar ortaya çıkmaktadır. Laktoz intoleransı dünyada sindirim bozukluğu yönünden karşılaşılan sorunların başında yer almaktadır. Bu sorun beyaz tenli yetişkinlerde %10-30 iken, zencilerde ve Asya toplumlarında %90'a kadar çıkmaktadır. Bu sonuçlar yeryüzünde yaşayan her 10 insandan birinin süt ürünlerini sindirmede güçlük yaşadığını göstermektedir.

Sütün ana karbonhidratı olan laktozun hidrolizi asitlerle veya enzimlerle meydana gelmektedir. Asit kullanılarak laktozun hidrolize edilmesi ile süt ve süt ürünlerinde tadında, renginde ve kokusunda bozulmalar meydana gelmektedir. Enzimlerle hidroliz edildiğinde ise sütün sadece tadında bir değişiklik olup sütün tatlılık derecesini dört kat artırmaktadır. Genel olarak β -Galaktosidaz hayvanların, bitkilerin yapılarında ve mikroorganizmalarda yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Kararlı bir yapı göstermesi ve yüksek enzim aktivitesini ortaya koyması nedeniyle bakteriyel içerikli β -galaktosidazlara diğerlerine göre daha çok rağbet edilmektedir. Bitkisel ve hayvansal enzimlerin ticari değeri mikrobiyal enzimlere kıyasla daha düşüktür.

Yeni izole edilen yabani tip bakterilerin, enzim kaynağı olarak tespit edilip üretim parametrelerinin optimize edilmesi özellikle sağlık alanında kullanılan enzimler için önemli bir adımdır. Başlangıçta Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanan bu çalışmada danışman tarafından Bitlis Budaklı Kaplıcasından yeni izole edilen *Bacillus licheniformis* VO2 ve (Erişim Numarası: KJ842086.1) *Bacillus licheniformis* VO9 (Erişim Numarası: KJ842092.1) kullanılarak, katı hal fermantasyonu yöntemiyle bitkisel atıklardan galaktozidaz enziminin üretim parametreleri için yöntem optimizasyonu yapılmıştır. Yapılan bu çalışma ile termofilik bakteriler açısından yerel gen kaynaklarımızın önemli bir kısmını teşkil eden Bitlis Budaklı Kaplıcasından izole edilen bakteriler kullanılarak, özellikle biyoteknolojik olarak büyük önem taşıyan sıcaklığa dirençli β -Galaktozidaz enzimini üreten bakterileri tespit etmek ve bu enzimlerin bol ve ucuz bir şekilde üretilmelerine olanak sağlamaktır.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
1.GİRİŞ	1
1.1.Laktoz (Süt şekeri)	1
1.2. β -Galaktosidaz	3
1.3. β -Galaktosidaz'ın Fizyolojik Önemi ve Genel Özelliği.....	5
1.4.Laktoz İntolerans	5
1.5. β -Galaktosidazın Kullanım Alanları	7
1.5.1.Sütteki laktozun uzaklaştırılmasındaki kullanımı	7
1.5.2.Peyniraltı suyundaki laktozun uzaklaştırılması için kullanımı.....	8
1.5.3.Oligosakkaritlerin sentezlenmesinde kullanımı	9
1.6.Katı Faz Fermantasyonu (KFF)	10
2.LİTERATÜR ARAŞTIRMASI.....	11
3. MATERYAL VE METOT	18
3.1.Biyolojik Materyal.....	18
3.2.Besiyerleri	18
3.2.1.Sıvı besiyeri	18
3.2.2.Katı besiyeri	18
3.3. İzolatların İzolasyon İşlemi	19
3.4. Filogenetik Analizler	19
3.5.İzolatların Üretimi	19
3.6.Gram Boyama.....	19
3.7.Spor Boyama	20
3.8.Antibiyotiklere Karşı Duyarlılık Testi	20
3.9.Kimyasal Maddeler	21

3.9.1.Karbon kaynakları	21
3.9.2.Azot kaynakları	21
3.10.Kullanılan Aletler	21
3.11.Çözeltiler	21
3.11.1.Tampon çözeltiler.....	21
3.11.2.ONPG'nin hazırlanması	21
3.11.3.Sodyum karbonatın hazırlanması	22
3.11.4.Alkalin çözeltisi	22
3.12. β -Galaktosidaz Aktivite Tayini.....	22
3.13.Protein Miktar Tayini	23
3.14.Katı Faz Fermantasyonu (KFF).....	23
3.15. β -galaktosidaz Üretimine Etki Eden Faktörler	24
3.15.1.İnkübasyon süresi.....	24
3.15.2.Sıcaklık	24
3.15.3.pH	24
3.15.4.Uygun substrat seçimi	24
3.15.5.Uygun substrat parça büyüklüğünün tespiti.....	25
3.15.6. Substrat ve nem miktarının tespiti	25
3.15.7.Çalkalama Hızının tespiti	25
3.15.8.Uygun ekim miktarının tespiti.....	25
3.15.9.Karbon kaynakları (%1).....	25
3.15.10.Azot kaynakları (%1)	25
3.15.11.Farklı metal tuzlarının etkisi.....	26
3.15.12.Farklı surfaktanların etkisi.....	26
3.15.13.Farklı sıcaklık değerlerinin enzim stabilitesi üzerine etkisi ..	26
3.15.14.Farklı pH değerlerinin enzim stabilitesi üzerine etkisi	26
4.BULGULAR	27
4.1.Bulgular.....	27
4.1.1. β -galaktosidaz Üretimi İçin Uygun İzolat Seçimi.	28
4.1.2.VO ₂ veVO ₉ 'un Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri	28
4.1.3.Boyama Testleri	28
4.1.3.1.Gram boyama.....	28

4.1.3.2.Spor boyama	29
4.1.3.3.Antibiyotik duyarlılık testi	29
4.1.4.İzolatlarda 16S rRNA Dizi Analizi	31
4.1.5.Mikroorganizmaların Uygun Büyüme Ortamlarının Tespiti	34
4.1.5.1.İnkübasyon süresinin mikroorganizmaların gelişimi üzerine etkisinin araştırılması.....	34
4.1.5.2.Sıcaklığın mikroorganizmaların gelişimi üzerine etkisinin araştırılması.....	34
4.1.5.3.pH'nın mikroorganizmaların gelişimi üzerine etkisinin araştırılması.....	35
4.1.6.Uygun Substrat Seçimi.....	36
4.1.7.Uygun Substrat Parça Büyüklüğünün Tespit Edilmesi.....	38
4.1.8. Uygun Substrat ve Nem Miktarının Tespiti.....	39
4.1.9. Uygun Çalkalama Hızının Tespiti	40
4.1.10. Sıcaklığın 2 ve 9 nolu İzolatlarda β -galaktosidaz Üretimi Üzerine Etkisi	41
4.1.11. pH'nın 2 ve 9 nolu İzolatlarda β -galaktosidaz Üretimi Üzerine Etkisi.....	42
4.1.12.Ekim Miktarının 2 ve 9 nolu İzolatlarda β -galaktosidaz Üretimi Üzerine Etkisi	43
4.1.13.Farklı Karbon Kaynaklarının 2 ve 9 nolu İzolatlarda β -galaktosidaz Üretimi Üzerine Etkisi.....	43
4.1.14.Farklı Azot Kaynaklarının 2 ve 9 nolu İzolatlarda β -galaktosidaz Üretimi Üzerine Etkisi.....	44
4.1.15.Farklı Metal Tuzlarının 2 ve 9 nolu İzolatlarda β -galaktosidaz Üretimi Üzerine Etkisi.	45
4.1.16.Farklı Sürfaktanların β -galaktosidaz Üretimi Üzerine Etkisi... ..	46
4.1.17.Farklı Sıcaklık Değerlerinin Zamana Bağlı Olarak β -galaktosidaz Stabilitesi Üzerine Etkisi.	46
4.1.18.Farklı pH Değerlerinin Zamana Bağlı Olarak β -galaktosidaz Stabilitesi Üzerine Etkisi.....	48

5.1.Sonuçlar.....	50
5.2.Öneriler	54
6. KAYNAKLAR.....	56

1.GİRİŞ¹

Enzimler canlı hücreler tarafından meydana getirilen, kimyasal reaksiyonlara etki ederek reaksiyonları katalizleyen protein yapılı maddelerdir. Enzimin bilimsel anlamda kullanımı ilk kez 1878 yılında Kuhne tarafından ele alınmıştır. Daha sonra Eduard Buchner 1897 yılında hücrelerden işlevsel bir şekilde enzimleri ekstrakte ettiğini bildirmiştir (Paulo ve Gübitz, 2003). Enzimler etki ettiği reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürerek tepkimenin hızını, kimyasal reaksiyonlara göre 10^8 - 10^{10} kat etki ederek reaksiyonun hızını arttırmırlar (White ve ark., 1978).

Enzimler etki ettiği reaksiyona göre 6 ana kategoriye ayrılmıştır. Bunlar Oksidoretükteazlar, Transferazlar, Hidrolazlar, Liyazlar, İzomerazlar ve Ligazlar olarak gruplandırılmıştır (Gözükara, 1997). Hidrolazların çoğu mikrobiyal kökenli olup ticari enzimlerin hemen hemen hepsi bu grupta yer almaktadır.

Enzimler endüstriyel kullanımlarına göre dünya çapında geniş bir pazara sahiptir. Enzimlerin bu pazardaki ekonomik değeri milyarlarca dolara tekabül etmektedir. Enzimler, deterjan sanayisinde % 37, tekstil sanayisinde % 12, nişasta endüstrisinde %11, ekmekçilikte % 8, hayvan yemi sanayisinde % 6 ve toplamda % 75'lik pazar payına sahiptir (Tanyıldızı, 2007). Dünya genelinde işlem gören endüstriyel enzimlerin yaklaşık % 60'ı Avrupa'da, % 40'ı da ABD ve Japonya'da üretilmektedir.

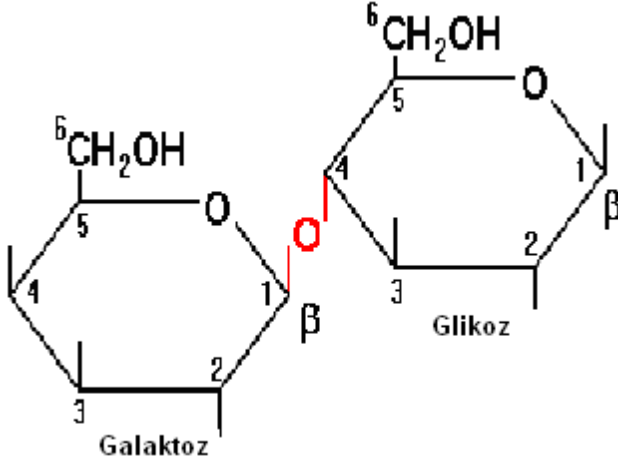
Mikrobiyal yapılı enzimler gıda, kâğıt, tekstil, ilaç, zirai ve deterjan endüstrilerinde oldukça geniş bir kullanım yelpazesine sahiptir. Endüstriyel alanda kullanılmak üzere farklı enzimleri üreten başka bakteriyel izolatların elde edilmesi yönünde yapılan çalışmalara olan ilgi devam etmektedir (Ghorbel ve ark., 2009).

1.1.Laktoz (Süt şekeri)

Laktoz, bir molekül galaktoz ve bir molekül glikozun birleşimi ile oluşmuş dissakarit yapısına sahiptir. Laktoz sadece süt ve süt ürünlerinde bulunur.

Tatlılık bakımından oranı monosakkaritlere göre oldukça düşüktür (Chapman and Hall, 1990).

¹ Bu çalışma Dr. Veysi OKUMUŞ'un danışmanlığında Erkan YILMAZ tarafından hazırlanan yüksek lisans tezinden üretilmiştir.



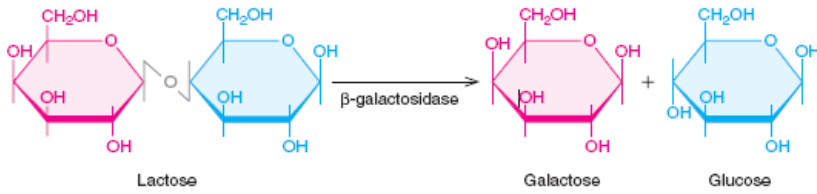
Şekil 1.1. Laktoz

Laktozun sindirimine bağlı olarak çözünürlüğü düşük olduğundan kalın bağırsakta biriken fazla laktoz molekülü ozmotik etkiye neden olarak dokunun susuz kalmasına, dokularda çok az miktarda kalsiyum emilmesine ve mikrofloranın laktoz fermantasyonu neticesinde sulu ishal, şişkinlik, gaz, karın ağrısı, bulantı ve kusmaya bağlı şikayetler şeklinde kendini gösteren rahatsızlıklar ortaya çıkmaktadır (Panesar ve ark., 2010).

Sütün ana karbonhidratı olan laktozun hidrolizi asitlerle veya enzimlerle meydana gelmektedir. Asit kullanılarak laktozun hidrolize edilmesi ile süt ve süt ürünlerinde tadında, renginde ve kokusunda bozulmalar meydana gelmektedir. Enzimlerle hidroliz edildiğinde ise sütün sadece tadında bir değişiklik olup sütün tatlılık derecesini dört kat artırmaktadır (Pivarnik ve ark., 1995).

1.2. β -galaktosidaz

β -galaktosidaz (β -D-galaktozid galaktohidroliz, (E.C.3.2.1.23), laktozu substrat olarak kullanarak bu disakkaritteki β -galaktosid bağının enzimatik hidrolizini gerçekleştirir. Ürün olarak da tatlılık oranı ve çözünürlüğü laktoza oranla daha fazla olan glikoz ve galaktoz monosakkaritleri oluşur (Gül Güven ve ark., 2007).



Şekil 1.2. β -Galaktosidaz ile laktozun hidrolizi (Weaver, 2004).

β -galaktosidaz Kalifornia denizaslanı hariç memelilerin hepsinde bulunur. İnsan ince bağırsağında üç farklı β -galaktosidaz enzimi mevcuttur.

1-)Laktaz: İnce bağırsak epitelinin kenar membranında bulunur. Besinlerle alınan laktozu glikoz ve galaktoza hidroliz eder.

2-)Asit β -galaktosidaz: ince bağırsak epitel hücre lizozomlarında mevcuttur.

3-)Hetero- β -galaktosidaz: ince bağırsağın epitel hücre sitoplâzmasında yer alır.

Asit ve Hetero β -galaktosidaz'ın besinlerle alınan laktozun hidrolizinde rolü görülmemektedir (Tunç, 2006).

Genel olarak β -Galaktosidaz hayvanların, bitkilerin yapılarında ve mikroorganizmalarda yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Kararlı bir yapı göstermesi ve yüksek enzim aktivitesini ortaya koyması nedeniyle bakteriyel içerikli β -galaktosidazlar diğerlerine göre daha çok rağbet edilmektedir. Bitkisel ve hayvansal enzimlerin ticari değeri mikrobiyal enzimlere kıyasla daha düşüktür. Mayalar ve küfler mikrobiyal kaynaklı yapılar olarak gösterilmektedir (Godfrey ve ark., 1996).

Bitkiler	Şeftali, kayısı, badem, kefir taneleri, yaban gülü, kahve
Hayvan Organları	İnce bağırsak, Beyin ve deri dokusu
Maya	<i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Kluyveromyces fragilis</i> , <i>Candida pseudotropicalis</i> , <i>Brettanomyces anomolus</i> , <i>Wingea robersii</i>
Bakteri	<i>Escherichia coli</i> , <i>Thermus aquaticus</i> , <i>Bacillus sp.</i> , <i>Bacillus megaterium streptococcus lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Bacillus circulans</i> , <i>Bacillus stearotherophilus</i> , <i>Lactobacillus sporogenes</i>
Mantar	<i>Neurospora crassa</i> , <i>Mucor pucillus</i> , <i>Alternaria palmi</i> , <i>Asperigillus foetidus</i> , <i>Mucor mieheri curvularia inoequalis</i> , <i>Asperigillus niger</i> , <i>Fusorium moniliforme</i> , <i>Asperigillus flovus</i> , <i>Alternaria alternara</i> , <i>Asperigillus oryzae</i> , <i>Asperigillus phoenicis</i>

Tablo1.1. β -galaktosidaz Enziminin Bulunduğu Kaynaklar (Gekas V. ve ark., 1985).

1.3. β -galaktosidaz'ın Fizyolojik Önemi ve Genel Özelliği

β -galaktosidazı ortaya çıkarmak amacıyla o-nitrofenilbeta-D galaktosid (ONPG) testi uygulanarak belirlenir. β -galaktosidaz ortamda bulunan laktozu hidrolizleyen bir enzimdir. Galaktosidaz ortamında pozitif bir bakteri mevcutsa, renksiz olan ONPG hidroliz olarak, sarı görünümlü bir madde olan Onitrofenol (ONP) açığa çıkar. Pozitif reaksiyon olması o maddenin gözükmesine dayanır. Açığa çıkan O-nitrofenol, alkali bir çözeltide, tautomerik etki göstererek sarı görünümlü bir renk oluşturur (Arda, 2000).

β -galaktosidaz tarafından hidrolize uğramamış bir laktoz çocuklarda büyümeyi engellediği gibi yetişkin bireylerde her hangi bir yararı olmamaktadır (Stryer, 1981).

Molekül ağırlığı bakımından β -galaktosidaz organizmadan organizmaya farklılık gösterir. *E.coli*'ye ait enzimin molekül ağırlığı yaklaşık 116,353 kDa'dır (Zhou ve ark., 2001). *Bifidobacterium longum* CCRC 15708 ait β -galaktosidaz enziminin molekül ağırlığı ise 357 kDa'dır (Hsu ve ark., 2006).

β -galaktosidaz için Ca^{+2} iyonu bir inhibitör olarak rol oynamaktadır. Ama sütte fazlaca bulunan Ca^{+2} iyonları enzimin işlevini inhibe etmesi gerektirirken enzim aktivitesinde herhangi bir düşme olmamaktadır. Çünkü Ca^{+2} iyonlarının tamamı serbest halde olmayıp kazeine bağlı bir şekilde yer almaktadır (Garman ve ark., 1996).

β -Galaktosidaz ince bağırsak hücreleri tarafından üretilmekte olup laktozu hidrolizlemesi sonucu meydana gelen glikoz ve galaktoz tekrar ince bağırsak hücreleri tarafından emilerek dolaşım sistemine oradan da karaciğere gelerek metabolize olmaktadır (Lartillot, 1993).

1.4. Laktoz İntoleransı

Sütte disakkarid yapıda yer alan laktoz, glikoz ve galaktozun birleşmesiyle meydana gelir. Laktoz intolerans laktozu parçalayan enzimin yani laktazın bulunmaması veya işlevini yerine getirmemesi durumunda oluşmaktadır. Bu da süt veya süt ile üretilmiş ürünlerin sindiriminde güçlük yaşanmasına neden

olmakta buna bağılı olarak da ishal, şişkinlik ve aşırı gaz çıkarma şeklinde belirtiler kendini göstermektedir. Laktoz intoleransı dünyada sindirim bozukluğu yönünden karşılaşılan sorunların başında yer almaktadır.

Bu sorun beyaz tenli yetişkinlerde % 10-30 iken, zencilerde ve Asya toplumlarında bu oran % 90'a kadar çıkmaktadır. Bu sonuçlar yeryüzünde yaşayan her 10 insandan birinin süt ürünlerini sindirmede güçlük yaşadığını göstermektedir.

Etnik Grup	% populasyon
Kuzey Avrupalı	<10
Merkez ve Güney Avrupalı	70
Batı Asya	100
Yerli Amerikalı	80-100
Meksikalı Amerikalı	53
Güney Afrikalı	13-90

Tablo1.2. Dünyadaki yaygın β -galaktosidaz eksikliği (Vesa ve ark., 2000).

Laktaz ince bağırsağın yüzeyinde yer alan bir enzim olup doğumla birlikte en yüksek seviyesine ulaşmakta, iki yaşından sonra enzimin göstermiş olduğu aktivitede azalmalar olmakta böylece laktoz intoleransı zaman içinde kendini göstermektedir.

Bu eksikliğin tanısı genel olarak klinik bulgular ile yapıldığı gibi bilinen en basit yöntem (evde kendin yap testi) öncelikle birkaç gün laktoz içeren besinlerin tüketilmesinden uzak durulmasıdır. Daha sonra iki bardak yağsız süt içilir. Eğer karın ağrısı ve şikâyetler kendini gösterirse laktoz intoleransınız var demektir. Bunun kesin tanısı için bazı laboratuvar incelemelerinin yapılması gerekebilir. Bunlardan biri de Soluk testidir. Bu testte laktoz içeren bir sıvı içildikten sonra soluk alıp verme sırasında hidrojen gazı ölçülür, ya da laktoz tolerans testi yapılarak bu hastalığın olup olmadığı öğrenilebilir (drahmetdobrucali.com/hastaliklar/laktoz-intoleransi).

1.5. β -galaktosidazın Kullanım Alanları

Enzimatik olarak hidrolizi gerçekleşen laktozun sağlık, gıda ve çevreye olan katkısına bakıldığında oldukça yararlı sonuçları görülmektedir. Laktozun β -galaktosidaz tarafından yapılan hidrolizi ya asitle yüksek sıcaklıkta (150°C)'de ya da β -galaktosidazın uygun pH ve uygun sıcaklık şartlarına göre enzimatik kataliziyle olmaktadır (Ramakrishnan ve ark., 2008).

Laktozun hidroliziyle oluşan glikoz ve galaktozun tatlılığı laktoza kıyasla daha fazla olması, laktozun parçalanması endüstriyel açıdan oldukça önemlidir.

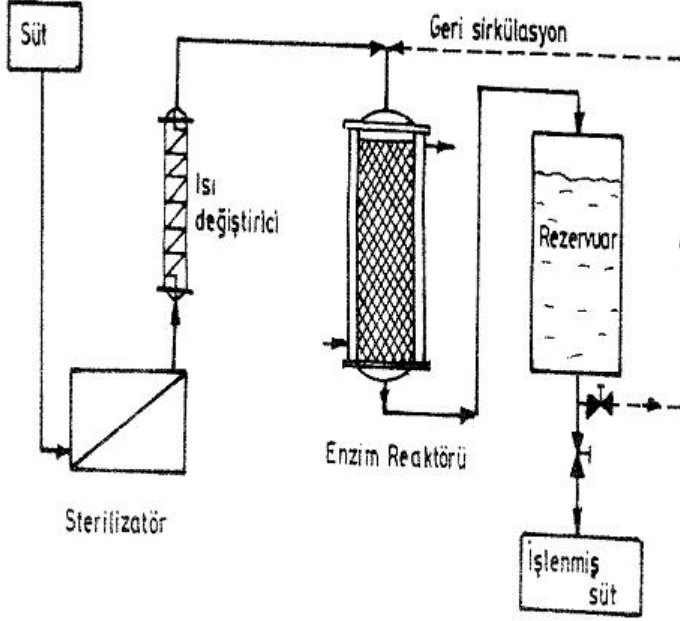
Şekerin Adı	Tatlılık Oranı
Sakaroz	100
Laktoz	40
Glikoz	75
Galaktoz	70

Tablo.1.3. Şekerlerin tatlılık oranları

1.5.1.Sütteki laktozun uzaklaştırılmasındaki kullanımı

Yeryüzündeki yetişkin insan popülasyonunun yaklaşık %80'i süt ve süte dayalı ürünleri yeteri kadar tüketememektedir. Bunun ana sebebi ise, bu insanların β -galaktosidaz eksikliğinden kaynaklanan süt ve süt ürünlerine dayalı laktozu sindirememelerinden kaynaklanmaktadır. Tüketilen süt, karın ve gaz ağrısı gibi bağırsak ağrılarına neden olmaktadır (Ramakrishnan ve ark., 2008).

Bu sorunu önlemek için sütteki laktoz, β -galaktosidaz tarafından hidrolizlenerek glikoz ve galaktoza dönüştürülür. Yüksek oranda laktoz ihtiva eden dondurulmuş sütlütatlılarda, laktoz kristalleşmesi neticesinde kumlu bir görünüm oluşur bu da endüstriyel açıdan büyük bir dezavantajdır. Ancak β -galaktosidazın yardımıyla bu şekilde oluşan ve istenmeyen kristallenmeleri donmuş süt ürünlerinde bulunan laktoz konsantrasyon düzeyi azaltılarak giderilir (Grosova ve ark., 2008).



Şekil.1.3. Sütteki laktozun hidrolizine ait işlem seması

1.5.2. Peyniraltı suyundaki laktozun uzaklaştırılması için kullanımı

Peyniraltı suyu (PAS) genellikle fabrikalarda sütün işlenmesinden sonra atık bir madde olarak yer almaktadır. Sütün peynir olarak mayalanması veya diğer organik asitlerle katılaştırılmasından sonra peynirin temel yapısını oluşturan kazeinin çökmesiyle arta kalan yeşilimsi sarı renkte olan bir sıvıdır. İçerik olarak zengin yapıda olan peyniraltı suyu gelişmiş ülkelerde ilaç, gıda, yem ve laktoz üretimi şeklinde kullanımı mümkün iken maalesef ülkemizde PAS'lardan ekonomik bir kazanç sağlamadan toprak veya dış ortama atılmaktadır (Kurt 1996, Kayaoğlu ve ark., 2007).

β -galaktosidazın peynir suyunda bulunan laktozun hidrolizinde ve çevre kirlenmesine yol açan süt atıklarının değerlendirilmesinde kullanımı oldukça önemlidir. Peyniraltı suyundaki laktozun β -galaktosidazla hidroliz edilerek çevresel kirlenmenin önüne geçildiği gibi önemli derecedeki hidroliz

ürünlerinin gıda sektöründe tatlandırıcılara alternatif olarak kullanılmasıyla geri kazanılabilir (Dağbağlı, 2009).

Peyniraltı suların hidroliz işlemlerinden sonra geri dönüşüme alınarak insanların ve hayvanların besinlerinde kullanılabileceği gibi laktoz içermeyen başka besinlerin veya ürünlerin geliştirilmesinde değerlendirilmektedir (Ladero ve ark., 2001).

Peyniraltı sularından laktozun geri elde edilmesiyle bisküvi, çikolata, dondurma, hazır çorba yapımında ve şarküteri ürünlerinin elde edilmesinde ayrıca süt tozu yerine geçebilen benzer ürünlerin elde edilmesiyle ekonomik bir yarar sağlamaktadır (Uhlig, 1998). Laktaz enzimiyle etkileşimde bulunan Peyniraltı suyu gıda sektöründe şekerleme olarak, fırın ürünleri ve şurup üretimine dayalı uygulamalarda kullanılmaktadır.

1.5.3.Oligosakkaritlerin sentezlenmesinde kullanımı

β -galaktosidaz transgalaktozilasyon ya da geri dönüşüm reaksiyonuyla bağırsakta faydalı bulunan izolatların gelişmesine etki eden galaktooligosakkaritlerin oluşumunu sağlamaktadır (Brena ve ark., 2002). Maliyet bakımından ucuz ve verimli bir yöntem olmasından dolayı galaktooligosakkaritlerin üretimine olan rağbet gün geçtikçe artmaktadır.

Oligosakkarit meydana gelmesi miktarı ve çeşidi yönünden transgalaktozil reaksiyonuna bağlı bir biçimde enzimin kaynağına, çeşidine ve substrat konsantrasyonuyla ilişkilidir (Mahoney, 1998).

Oligosakkaritler laktoz yoğunluğuna bağlı olarak oluştuğundan, maksimum oligosakkarit üretimi yüksek laktoz yoğunluğuna bağlı olarak meydana gelmektedir bu da toplam şeker miktarının %30-40'na denk gelmektedir. Düşük laktoz yoğunluğunda, transferaz aktivitesinde azalma meydana gelir, bu durumda maksimum oligosakkarit kazanma oranı %22-25'tir (Huber, 1976).

Disakkaritler	β -D-Gal (1→6)-D-Glc	allolaktoz galaktobioz
	β -D-Gal (1→6)-D-Gal	
	β -D-Gal (1→3)-D-Glc	
	β -D-Gal (1→2)-D-Glc	
	β -D-Gal (1→3)-D-Gal	
Trisakkaritler	β -D-Gal (1→6)- β -D-Gal (1→6)-D-Glc	6' digalaktozil-glukoz 6' galaktozil-laktoz 6' galaktotrioz 3' galaktozil-laktoz 4' galaktozil-laktoz 6' digalaktozil-laktoz
	β -D-Gal (1→6)- β -D-Gal (1→4)-D-Glc	
	β -D-Gal (1→6)- β -D-Gal (1→6)-D-Gal	
	β -D-Gal (1→3)- β -D-Gal (1→4)-D-Glc	
	β -D-Gal (1→4)- β -D-Gal (1→4)-D-Glc	
Tetrasakkaritler	β -D-Gal (1→6)- β -D-Gal (1→6)- β -D-Gal (1→4)-D-Glc	6' digalaktozil-laktoz
	β -D-Gal (1→6)- β -D-Gal (1→6)- β -D-Gal (1→4)-D-Glc	
	β -D-Gal (1→6)- β -D-Gal (1→6)- β -D-Gal (1→4)-D-Glc	
Pentasakkaritler	β -D-Gal (1→6)- β -D-Gal (1→6)- β -D-Gal (1→6)- β -D-Gal (1→4)-D-Glc	6' trigalatozil-laktoz

Tablo 1.4. Laktoz hidrolizi boyunca oluşan oligosakkaritlerin yapıları (Mahoney, 1998).

1.6. Katı Faz Fermantasyonu (KFF)

Katı faz fermantasyonu (KFF) suyun az bulunduğu veya susuz bir ortamda katı (nemli) metaryal üzerinde mikroorganizmaların fermantasyonudur. KFF tekniği mikroorganizmaların doğal yaşam alanlarına benzemesi ve bu canlıların çoğalması bakımından uygun ortam sağlanmasıyla tercih edilmektedir (Singhania ve ark., 2009).

KFF tekniği enzim üretimi için zengin bir ortam olmakla birlikte tarımsal atıkların kullanılmasında oldukça avantajlı bir tekniktir. Avantajları arasında ekonomik ve çevre dostu olması, suya gereksinimi az olması gibi durumlar sayılabilmektedir (Pandey, 2003). KFF tekniğinde farklı katı substratlar kullanılabilir (buğday kabuğu, pirinç kabuğu, muz kabuğu, mecimek kabuğu, arpa kabuğu vb.). Sonuç ve kullanım bakımından genel olarak en iyi sonuç buğday kabuğunda gözlemlendiği rapor edilmiştir (Pandey ve ark., 1999). KFF tekniğiyle üretilen enzimler arasında amilaz, proteaz, ksilanaz, pektinaz, selülaz vb. bulunmaktadır (Onasakponome, 2017).

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

Chakraborti ve ark. (2003), Hindistandaki Manikaran'dan yalıtılmış termofilik *Bacillus polymyxa*'dan β -galaktosidaz enzimi hakkında yapılan çalışmalarda enzimin optimal sıcaklığını 60°C ve pH'sını (7.0) olarak tespit etmişlerdir.

Boon ve ark. (2000), *Bacillus circulans*, *Aspergillus oryzae*, *Kluyveromyces lactis* ve *Kluyveromyces fragilis*'den izole edilerek kullanılan β -galaktosidaz enziminin 20°C, 30°C, 40°C ve 50°C'deki oligosakkaritlerin enzimatik oluşumunu araştırmışlar ve sıcaklık artışına bağlı olarak oligosakkarit oluşumunun da artış olduğunu belirlemişlerdir.

Hsu ve ark. (2005), *Bifidobacteria* türleri ile yaptığı çalışmalar içinde *B. longum* CCRC 15708 ile yapılan daha ileri çalışmalarda, en yüksek β -galaktosidaz seviyesinin sırasıyla karbon ve azot kaynakları olarak laktoz ve maya özütü ile üretildiğini ortaya koymuşlardır. Elde edilen β -galaktosidazın uygun enzim üretimi için gerekli olan optimum pH'sını (6.5) ve sıcaklığın 37 °C olduğunu saptamışlardır.

Khalid ve ark. (1991), psikotropik *Bacillus subtilis* KL88'den elde edilen β -galaktosidaz enzimine ait çalışmalar yapmışlardır. Laktozda bulunan β -D-glikozidik bağı spesifik olup enzim geçiş metal iyonları olan (Fe^{+3} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2}) tarafından yarışmalı olarak inhibe edildiğini tespit etmişler, ayrıca Ca^{+2} iyonunun yüksek konsantrasyonlarında enzimi kısmen inhibe ettiğini bu çalışmaya bağlı olarak da alkalın metal iyonlarından (Na^+ , K^+ , Li^+) birçoğu tarafından enzimin aktive edildiğini bildirmişlerdir.

Vetere ve ark. (1998), *Bacillus circulans*'tan elde edilen β -galaktosidazın iyi bir transglükolitik etkinliğe sahip olduğunu ve enzimin şimdiye dek iki izoformu literatürde tarif edildiğini ancak araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda daha önce hiç açıklanmayan üçüncü bir izoformun varlığını rapor etmişlerdir. Bu üç formun moleküler ağırlıkları sırasıyla I. Enzim için 212 kDa, II. enzim için 145 kDa ve III. enzim için 86 kDa olarak belirtmişlerdir. O-nitrofenil- β -d-galaktopiranosid (ONPG) ve laktozun hidrolizine bağlı kinetik parametreler belirlenmiş ve ONPG için aşağıdaki Km değerleri sırasıyla I, II ve III için 3.6,

5.0 ve 3.3 mM, laktoz için sırasıyla 3.7, 2.94 ve 2.71 mM şeklinde belirlemişlerdir.

Vasiljevic ve ark. (2001), yaptığı çalışmalarda endüstriyel olarak üretilen β -galaktosidazların maksimum üretimi için en uygun kaynağın bakteriler olduğunu bildirmişlerdir. Bunu desteklemek için süt sanayisinde önemli bir yeri olan β -galaktosidazın üretimi için termofilik bir form olan laktik asit izolatlarını kullanmışlardır. Çalışmalarda termofilik izolatların β -galaktosidaz üretiminde önemli bir yere sahip olduğunu, kontemine riskinin minimum düzeyde olması ve sabit sıcaklıkta yapılan pastörizasyonda laktozun hidrolizini gerçekleştirmesinden dolayı β -galaktosidazın önemi belirtmişlerdir.

Chakraborti ve ark. (2000), *Bacillus sp.* MTCC 3088'den hücre dışı olarak elde edilen laktozdan galakto-oligosakarit üretimini katalizleyen β -galaktosidaz enzimini 36 kat saflaştırıp ve enzim karakterizasyonunu araştırmışlardır. Enzimin optimum pH ve sıcaklığını sırasıyla 8.0 ve 60 °C olarak saptamışlardır. Yapılan çalışmada enzimin metallere ve kimyasal maddelere karşı aktivitesi belirlenmiş ve Mg^{+2} 'nin iyi bir aktivatör ajan olduğunu belirlemişlerdir.

Gül ve ark. (2007), bir termoasidofilik olan *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp.'den elde edilen β -galaktosidaz enzimini 163 kez saflaştırmış ve bazı özelliklerini belirlemişler ve saflaştırılmış enzim için uygun pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 6,0 ve 65 °C olarak saptamışlardır.

Konsoula ve ark. (2007), yaptıkları çalışmada karbon, organik azot ve kompleks organik maddeler kullanarak *Bacillus subtilis*'ten hücre dışı termostabil α -amilaz ve β -galaktosidazı izole etmişlerdir. Organik azot olarak kullanılan tripton ve mısır küspesinin enzim üretimine etkisinin olumlu yönde olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar, çözünebilir nişastanın, mısır unu gibi çeşitli nişasta yapılı substratlar ile ikame edilmesi, her iki enzimin verimi üzerine pozitif bir etki gösterdiği ifade etmişlerdir. Ayrıca, farklı unlarla kombinasyon halinde mısır veya tripton kullanıldığında, her iki enzimin de iki misli daha yüksek oranda üretiminin sağlandığını belirlemişlerdir. Örneğin, mısır unu kullanılmış ve her iki enzim üzerine pozitif etki oluşturduğu, *B. subtilis* izolatı tarafından üretilen α -amilaz ve β -galaktosidazın sırasıyla 135 °C

ve 65 °C'de maksimum aktivite sergilediğini, ayrıca yükseltilmiş sıcaklıklarda belirgin bir şekilde stabil olduğunu saptamışlardır.

Ladero ve ark. (2006), termofilik *Thermus sp. strain T2* izolatından izole edilen β -galaktosidaz'ın serbest ve sabitleştirilmiş yapılarının termal ve pH inaktivasyonunun kinetik formu üzerinde araştırma yapmışlardır. Sıcaklığın 60 ve 90°C arasında değiştiğini, asit pH aralığını 3.0-5.0 ve bazik pH aralığını ise 10.0-13.0 olarak belirlemişlerdir. Yapılan çalışmada 50 g/L laktoz ile 50 mM ve pH 7,2 fosfat tamponu ihtiva eden laktik bir tamponda inaktivasyon sıcaklığının serbest enzim için 60-90°C, sabit enzimi için ise 80-90°C olduğunu saptamışlardır. Kinetik parametre sonuçları, özellikle asit koşullarında immobilizasyon ile elde edilen stabiliteyi yansıttığını ve bunun da asit peynir suyunun endüstriyel bir kazanç için avantaj sağlayacağını bildirmişlerdir.

Chang ve ark. (1989), *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus* izolatından β -galaktosidazı 109 kat saflaştırarak elde etmişlerdir. Bu enzimin spesifik aktivitesini 592 U/mg, verimi ise 37 °C'de %41 aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir.

Shaikh ve ark. (1999), yapılan çalışmada kullanılan *Rhizomucor sp.*'i termofilik bir mantar olup ekstraselüler şekilde izole edilen β -galaktosidaza bağlı yapılan çalışmada enzim karakterize etmişlerdir. Enzim için uygun aktivite olarak belirlenen sıcaklığın ve pH aralığı sırasıyla 60 °C ve 4,5 olarak ölçülmüştür. Buna bağlı olarakta 60 °C'de enzimin 4 saat boyunca kararlı yapıda olduğu gözlenmiş ve bu sonucun da, fungal β -galaktosidazlar için bildirilen en yüksek oranlardan biri olarak belirlemişlerdir.

Ohtsu ve ark. (1998), Atagawa kaplıcasından (Shizuoka, Japonya) izole ettikleri *Thermus sp. A4*'ten β -Galaktosidaz saflaştırıp karakterize etmişlerdir. Elde edilen enzimin 70 °C'de aşırı derecede ısıya dayanıklı olduğu buna bağlı olarakta 20 saat kuluçka süresinden sonra etkinliğini koruduğunu rapor etmişlerdir.

Nagy ve ark. (2001), yaptıkları çalışmalarda *Penicillium chrysogenum* NCAIM 00237 izolatının gelişimi ve β -galaktosidaz aktivitesine yönelik çeşitli karbon kaynaklarının araştırmasını yapmışlardır. *Penicillium chrysogenum*'un glikoz,

sükroz, gliserol ve galaktoz kullanılmasıyla iyi bir üreme eğrisi ortaya koyduğunu bildirmişlerdir. β-galaktosidaz aktivitesi laktoz kullanılmasıyla arttığını buna bağlı olarak kullanılan diğer karbonların ise aktivite açısından çok düşük düzeyde etkili olduğunu saptamışlardır.

Bury ve ark. (2001), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 11842 (LB 11842) izolatı %1 maya ekstraktı ekleyerek takviye edilmiş tatlı peyniraltı suyunda β-galaktosidazın aktivitesine olan etkisini araştırmışlardır. %1 maya ekstraktı besi yerine eklendiğinde β-galaktosidaz aktivite yönünden üç kat arttığını bildirmişler. % 1'lik maya ekstraktına bağlı mililitre başına dakikada 1.08 ± 0.15 μmol ONP salınım yapıldığını belirlemişlerdir.

Itoh ve ark. (1993), yaptıkları çalışmalarda *Lactobacillus kefiranofaciens* K-1 izolatından β-galaktosidaz izole edilerek elde edilen enzimin karakterizasyonunu incelemişlerdir. Enzim reaksiyonu için optimum sıcaklık ve pH sırasıyla 50 °C ve pH 6.5 kabul edilmiş bununla birlikte molekül ağırlığını ise ortalama olarak 311000 olarak tespit etmişlerdir. Enzim aktivitesi üzerine glikoz ve galaktozun inhibe etkisi olduğunu ama galaktozun inhibe etkisi diğer β-galaktosidazlarda görüldüğünden daha zayıf olarak kendini göstermiş. Enzim aktivitesine olan etkisi bakımından FeSO₄, AgNO₃ ve HgCl₂'ün inhibisyona neden olduğunu ama MnCl₂, ve MgCl₂'nin aktiviteyi etkilemediklerini bildirmişler. İyodoasetamid enzim aktivitesini inhibe ettiğini ama β-Mercaptoetanol ve L-sisteinin ise enzimi aktive ettiğini saptamışlar.

Ustok ve ark. (2010), *Streptococcus thermophilus* 95/2 (St 95/2) ve *Lactobacillus delbrueckii sspbulgaricus* 77 (Lb 77) izolatlarını Toros Dağı etrafından elde ederek bunları katışıksız ve karma bir kültür ortamına alıp üremesi sağlanarak izole edilen β-galaktosidazların biyokimyasal özellikleri yanında termal özelliklerinde karakterizasyonu yapmışlardır. Maksimum aktivite için optimum pH ve sıcaklık tespiti yapılarak bu enzimlerin pH aralığı 7.0-9.0 olarak, sıcaklık aralığını ise 20-37 °C 'de sabit kaldığını. Bununla birlikte başlangıçtaki aktivitelerinin % 80-90'ını koruduğunu gözlemlemişlerdir. Lb 77, St 95/2 ve karışık kültürlerden (Lb 77 ve St 95/2) β-galaktosidazın inaktivasyon enerjileri sırasıyla 51,3, 44,0 ve 48,3 kcal mol olarak tespit etmişlerdir. Bu enzimlerin süt ve süt ürünlerinin laktoz hidrolizi için potansiyel adaylar olarak düşünülebilir şeklinde rapor etmişlerdir.

Alazzeh ve ark. (2009), *Lactobacillus reuteri* izolatu tarafından elde edilen α ve β -galaktosidazların indüklenmesine dayalı araştırma yapmışlardır. Enzimin elde edilmesine yönelik değişik karbon ve azot kaynaklarının yaptığı etkiyi gözlemlenmişlerdir. Yapılan çalışmada kullanılan karbon kaynakları arasında laktozun en yüksek β -galaktosidaz aktivitesi gösterdiğini bununla birlikte azot kaynağı olarak en iyi aktiviteyi gösteren maya ekstraktı olduğunu bildirmişlerdir.

Huifang ve ark. (2017), çalışmalarında ticari olarak farklı GOS profillerinin detaylı bir analizi üzerine araştırma yapmışlar. Bunun için β -galaktosidazın kullanımı ve verimli bir şekilde elde edilmesi üzerine yapılan çalışmada, *Bacillus circulans*, *Kluyveromyces lactis* ve *Aspergillus oryzae*'den elde edilen β -galaktosidazların verilerinin karşılaştırılmasını yapmışlar. Bu enzimlerin verimleri, % 48,3 (*B. circulans*) ile % 34,9 (*K. lactis*) ve % 19,5 (*A. oryzae*) arasında değişen farklılıklar elde etmişlerdir. Süt endüstrisinde β -galaktosidaz enzimlerinin laktozu galaktooligosakkaritlere dönüştürmek için kullanıldığını ve galaktooligosakkaritlerin (GOS) bazı moleküllerin taklit edilmesi yönünden ticari boyutu bakımından önemli olduğunu rapor etmişlerdir.

Shing, ve ark. (2002), termofilik bir bakteri olan *Bacillus coagulans* RCS3 izolatından izole edilen β -galaktosidaza ait uygun pH ve sıcaklık değerlerini araştırmışlardır. En uygun sıcaklık ve pH aralığını sırasıyla 65 °C ve 6.0-7.0 olarak gözlemlenmişlerdir. β -galaktosidazın pH 5-8'de sabit olup, pik aktivitesinin ise pH 6.0-7.0 aralığında olduğunu saptamışlardır. Enzim üretimi 50 °C'de maksimum iken, en yüksek aktivite 65 °C olduğu tespit etmişler. Hidroliz ürününün galaktoz tarafından güçlü ve rekabetçi bir şekilde engellendiği tespit etmişlerdir. Özellikle 0.5-2.0 mM konsantrasyon aralığına sahip artı iki değerlikli katyonların (Ni^{+2} , Hg^{+2} , Cu^{+2}) aktiviteyi olumsuz yönde etkileyerek inhibe ettiğini bunlara bağlı kalarak gerek sıcaklık gerekse pH'da olumlu bir denge sağlaması yönünde enzimin endüstriyel alanda kullanışlı olacağını belirtmişlerdir.

Wang ve ark. (2009), *Bacillus megaterium* 2-37-4-1'in kullanılmasıyla elde edilen β -galaktosidazı izole ederek buna bağlı olan (BgaBM) geninin çözümlenmesini yaparak ekspresini yapmışlardır. Enzimin en uygun pH aralığı 7.5-8.0, sıcaklık aralığı ise 55 °C olarak tespit edilmiş. pH 6.0-9.0 arasında ve

sıcaklığın 40 °C altında olduğu durumlarda enzimin stabil bir yapıda olduğunu rapor etmişlerdir.

Sarıgül, (2007), Ege Bölgesinde yer alan sıcaklıkları 55-95 °C arasında değişen ve pH aralığı ise 6.0-9.5 bulunan farklı su kaynaklarından *Thermus* genusuna ait suşların izolasyonu yapılarak, bunların moleküler yöntemlerle karakterizasyonunu yapmış ve elde edilen β-galaktosidazların aktivitesini ölçmeye bağlı araştırma yapmışlardır.

Neri ve ark. (2009), *Kluyveromyces lactis*'ten izole ettikleri β-galaktosidaz enzimi için aktifleştirici madde olarak glutaraldehit kullanmışlar. Araştırmacılar, enzimin optimum pH'sını 6.5 ve optimum sıcaklığını 50 °C olarak saptamışlardır.

Song ve ark. (2010), Antarktika'daki deniz sedimentinden psikotolerant bir maya olan *Guehomyces pullulans* 17-1'den izole edilen β-galaktosidazı araştırmışlardır. Saflaştırılmış ekstraselüler β-galaktosidazın molekül ağırlığı 335 kDa olarak belirlenmiş ayrıca β-galaktosidaza ait uygun pH ve sıcaklık değeri olarakta sırasıyla 4.0 ve 50 °C tespit etmişlerdir.

Fan ve ark. (2015), bu çalışmada kullanılan bir psikrofilik gram-negatif bakteri olan *Rahnella sp*'den izole edilen β-galaktosidazı saflaştırılıp karakterize etmişlerdir. Çalışılan enzimin sekonder yapısının 45 °C'ye kadar stabil olduğunu ve 4 °C' gibi düşük sıcaklıklarda da aktif olduğunu bildirmişlerdir.

Xuguo ve ark. (2016), yaptıkları çalışmada *Escherichia coli* BL21 (DE3)'ü kullanarak izole ettikleri β-galaktosidaz için Optimal hücre dışı β-galaktosidaz aktivitesi için optimum sıcaklığı 37 °C olarak saptamışlardır.

Dandan ve ark. (2017), *Aspergillus niger* kullanarak izole ettikleri β-galaktosidazın biyokimyasal olarak enzim karakterizasyonunu yapmışlar. β-galaktosidaza ait lacA tarafından kodlanan LacA'nın bilinen aktivitesine ek olarak, üç lacB, lacC ve lacE genleri tarafından kodlanan β-galaktosidazlar için optimum pH ve sıcaklıkları LacB ve lacE için pH 4.0, 5.0 ve 50 °C'de maksimum hidrolitik aktiviteye sahipken, LacC ise pH 3.5 ve 60 °C'de maksimum aktivite gösterdiğini saptamışlardır.

Musaalbakri ve ark. (2017), katı faz fermantasyon (KFF) teknolojisini kullanarak yeni biyo-rafineri işlemlerini, geleneksel işleme yollarına alternatif olarak geliştirmiş olup, tarım ve gıda sanayi hammaddelerinden katma değerli ürünlerin üretilmesini sağlamışlardır.

Cordoso ve ark. (2017), yaptıkları çalışmalarda, *Aspergillus laticoffeatus* ilk kez etkili bir β -galaktosidaz üreticisi olarak tanımlamışlardır. Burada izole ettikleri enzimleri biyokimyasal olarak karakterizasyonunu yapmışlardır. β -galaktosidaza ait optimum pH ve sıcaklık ham ekstrakt enzimi sırasıyla 3.5-4.5 ve 50-60 °C aralığında belirlemişlerdir.

Sara ve ark. (2017), mantar ağırlıklı yaptıkları çalışmalarda toplam 50 mantar türü kullanmışlardır. Mantarlardan izole ettikleri β -galaktosidaza ait optimum pH ve sıcaklık sırasıyla 3.0-5.5 ve 45-65 °C olarak saptamışlardır.

3.MATERYAL VE METOT

3.1.Biyolojik Materyal

Bu çalışmada Dr. Veysi OKUMUŞ tarafından Bitlis Budaklı Kaplıcasından alınan çamur örneklerinden izole edilen yabancı tip izolatlar biyolojik materyal olarak kullanıldı.

3.2.Kullanılan Besiyerleri

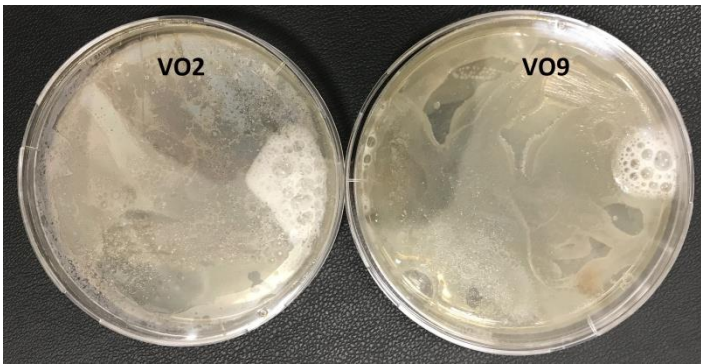
Nutrient Broth (NB) ve Nutrient Broth Agar besiyeri kullanıldı.

3.2.1.Sıvı besiyeri

8 gram NB, 1 litre saf suya eklendi ve tamamen homojen oluncaya kadar su içinde çözdürüldü. 121 °C'de 1 saat otoklavlanarak steril hale getirildi.

3.2.2.Katı besiyeri

8 gram NB'ye 15 gram agar eklenerek 1 litre saf suda çözününceye kadar karıştırıldıktan sonra, 121 °C'de sterilize edilerek, steril petri kaplarına 20-25 ml kadar aktarımı yapıldı.



Şekil 3.1.NB-Agar besiyerine ekilen izolatların 24 saatlik kültür görüntüsü ve katalaz aktiviteleri

3.3. İzolatların İzolasyon İşlemi

İzolasyon işlemi için 10 g çamur, steril bir ortamda 90 ml steril saf su ihtiva eden erleninde karıştırıldıktan sonra 10^{-1} 'lik seyreltmelerle elde edildi. Homojen bir şekilde elde edilen karışım daha sonra aynı şekilde seyreltme işlemleri yapılarak 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , ve 10^{-5} 'lik dilüsyonlar şeklinde farklı oranlarda seyreltilip süspansiyonlar elde edildi. Daha sonra farklı süspansiyonlardan 1 ml alınarak steril olan petri kutularına transfer edilip, 20 ml besiyeri eklenerek homojenize edildi. Yukarıdaki aşamalara başlamadan önce seyreltilen süspansiyonlar öncelikle 80 °C'de 10 dakika bekletilip ısı işleme maruz bırakıldı. Böylece sporlar canlılıklarını korurken, diğer mikroorganizmalar canlılıklarını yitirmektedir. Daha sonra seyreltilmiş süspansiyonlardan petri kutularına aktarılan sporlar 45 °C 24 saat boyunca inkübatör içerisinde inkübe edildi. Böylece saf koloniler halinde bakteri izolasyonu sağlandı.

3.4. Filogenetik Analizler

VO2 ve VO9 izolatları, birkaç kez alt kültüre alınarak saflaştırıldı ve izolatların 16S rRNA gen dizi analizi İTÜ Teknokent IONTEK Laboratuvarlarına gönderilerek yapıldı.

3.5. İzolatların Üretimi

Tek kullanımlık steril öze yardımıyla izolatların katı besi ortamından Nutrient Broth sıvı besiyerine ekimi gerçekleştirildi ve çalkalayıcıda 150 rpm'de 40 °C'de 24 saat inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyondan sonra besiyerinden 200 μ L alınarak daha önce otoklavlanmış sıvı besiyerlerine ekim yapılarak izolat üretimi sağlandı. Rölatif enzim aktivitesi yüksek olan VO2 ve VO9 nolu izolatlar sonraki enzim üretimi çalışmaları için kullanıldı.

3.6. Gram Boyama

NB katı besiyerinden öze yardımıyla alınan izolatlar serum fizyolojik damlatılmış lam üzerine yayma, kurutma ve tespit işlemi yapıldıktan sonra preparat hazırlandı. Hazırlanan preparat üzerine kristal viyole çözeltisi eklenerek 1 dakika bekletilip distile suyla yıkandıktan sonra preparat 1 dakika

lugol çözeltilisinde bekletildi. Preparat distile suyla yıkandıktan sonra %95'lik etanolda 10-15 saniye bekletilip distile suyla yıkandı. Son aşama olarak sulu fuksin veya safranin çözeltilisinde 30 saniye bekletilip distile suyla yıkandıktan sonra preparat kurutulup immersiyon yağı damlatılarak mikroskopta incelendi. Mor renkte görülen mikroorganizmalar gram pozitif pembe veya kırmızı renkte görülen mikroorganizmalar ise gram negatif olarak değerlendirildi (Atlas ve ark., 1995).

3.7.Spor Boyama

İzolatlar olumsuz şartlara daha dayanıklı bir yapı olarak adlandırılan endospor oluştururlar. Sporun boyanması için ısı işlemi gerekir, ısı işlemi boya spor kılıfı geçmekte ve hücre boyanmaktadır. Endospor boyamada kullanılan Schaeffer-Fulton yönteminde malaşit yeşili kullanıldı. Hazırlanan preparat kaynayan su banyosu düzeneğine yerleştirildi. Preparatın üzerine %5 malaşit yeşili konuldu. Boyanın üzerine küçük parçalı kurutma kâğıdı konulduktan sonra, kâğıdın üzerine malaşit damlatılarak preparatın kurumaması önlenmiştir. İşlem 5 dakika boyunca yapıldı. İşlem sonunda kâğıt parçacıkları alınarak preparat distile suyla yıkandı ve son olarak safranin ile 20 saniye boyandı. Boya işleminden sonra preparat yıkandı kurutulup mikroskopta incelendi. Sporangium kırmızı renkte ve endospor ise yeşil renkte görüldü (Karahana ve ark., 2002).

3.8.Antibiyotiklere Karşı Duyarlılık Testi

Mikroorganizmaların antibiyotiklere olan tepkisini belirlemek için yapılan bir testtir. Kullanılan en yaygın yöntem Kirby Buauer (KB) disk difüzyon testidir. Katı besi ortamına mikroorganizmaların öze yardımıyla yayılarak ekimi yapıldı. Ekimi yapılan yüzeye antibiyotiklerden oluşan diskler bırakılarak inkübasyona alındı. İnkübasyon süresinden sonra disklerin çevresinde zon olup olmadığına bakıldı ve zonun büyüklüğüne (mm) bağlı olarak değerlendirme yapıldı (Hudzicki, 2009).

3.9.Kimyasal Maddeler

3.9.1.Karbon kaynakları

Glikoz, galaktoz, früktoz, sükroz, nişasta, mannoz, ksiloz ve laktoz karbon kaynağı olarak kullanıldı.

3.9.2.Azot kaynakları

Maya ekstraktı, amonyum sulfat, tripton, amonyum asetat, glisin, pepton ve üre azot kaynağı olarak kullanıldı.

3.10.Kullanılan Aletler

- PH metre (Sartorius DOCU pH + METRE)
- Mikro-santrifüj (SIGMA 1-6S)
- Mikropipet (SOCOREX)
- Spektrofotometre (SHIMADAZU UV MİNİ-1240)
- İnkübatör (NÜVE EN 500)
- Çalkalayıcı inkübatörü (jero TECH SI-600)
- Shaker Su Banyosu (NÜVE ST 402)
- Güvenlik Dolaplar Hood (NÜVE LN 090)
- Otoklav (NÜVE OT 4060V)
- Mikroskop (OLYMPUS SC30)
- Steril Kabin (NUVE LN 090)

3.11.Çözeltiler

3.11.1.Tampon çözeltiler

0.1M pH 6.8 ve 0.1M pH 7.0 sodyum fosfat tamponu oluşturularak kullanıldı.

3.11.2.ONPG' nin hazırlanması

10 ml için 0.018g O-nitro-fenil- β -D- galactopyranoside (ONPG), 0.1M pH 6.8 sodyum fosfat tamponunda çözünmesi ile oluşturuldu.

3.11.3.Sodyum karbonatın hazırlanması

10.6g Na_2CO_3 100 ml distile suya tamamlanıp çözdürüldü. 1M Na_2CO_3 çözeltisi β -galaktosidaz enzim aktivitesinde reaksiyon sonlandırıcı olarak kullanıldı.

3.11.4.Alkalin çözeltisi

% 4 Na_2CO_3

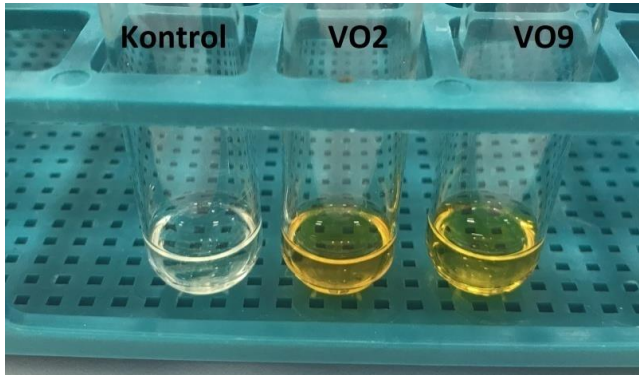
% 4 Na-K tartarat

% 2 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Beher içerisinde 100ml için %4 Na_2CO_3 hazırlandı. Farklı tüplerde hazırlanan Na-K tartarat ve CuSO_4 'tan 1'er ml ilave edilerek karışımları yapıldı. Protein miktar tayininin belirlenmesinde alkalin çözeltisi kullanıldı.

3.12.β-galaktosidaz Aktivite Tayini

β -Galaktosidaz aktivitesi 0.1M, pH 6.8 sodyum fosfat tamponu içerisinde 60 mM O-Nitro fenil- β -D-galactopyranoside (ONPG) çözeltisinden O-Nitrophenol ürününün ilavesiyle ile tespiti sağlandı. 200 μl enzim çözeltisine 500 μl substrat (ONPG) eklenerek 37°C'de 30 dk inkübasyona alındı. İnkübasyon süresi sonrasında 1M 500 μl sodyum karbonat çözeltisi eklenerek reaksiyon durdurulduktan sonra 420 nm'de spektrofotometrede ölçüm yapıldı (Konsula ve ark., 2007).



Şekil 3.2.VO2 ve VO9'da β -galaktosidaz aktivitesi

3.13. Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayini için Lowry yöntemi esas alınarak yapıldı. Hazırlanan tüplere 2.5 ml alkalın çözeltisi üzerine 25 μ l enzim ve 225 μ l distile su konularak, tüpler 15 dakika 40 $^{\circ}$ C'de otoklavda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra üzerine 1:1 oranında distile suyla seyreltilmiş 250 μ l Folin Reaktif (FCR, Sigma) eklenerek 30 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 660 nm'de spektrofotometrede okuma yapıldı (Lowry ve ark., 1951).

3.14. Katı Faz Fermantasyonu (KFF)

Uygulama için 3 g katı substrat olarak (parça büyüklüğü bakımından 1500 μ m olan muz, pirinç, arpa, buğday ve mercimek kabukları) alındı. Daha sonra 100 ml kapaklı cam şişelere 10 ml distile su konularak 120 $^{\circ}$ C'de 20 dakika otoklavlandı. Soğuma işleminden sonra bakteri ekimi yapılarak 40 $^{\circ}$ C 48 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra katı besiyeri steril gazlı bezle sıkılıp elde edilen sıvı 6000 rpm'de 4 $^{\circ}$ C'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant ham enzim kaynağı olarak kullanıldı.



Şekil.3.3. β -galaktosidaz üretimi için hazırlanan SSF besiyerleri

3.15.β-galaktosidaz Üretimine Etki Eden Faktörler

3.15.1.İnkübasyon süresi

İnkübasyon etki süresi için 100 ml'lik şişelerde 3g bitkisel atık bulunan besiyerlerine %1 bakteri ekimi yapılarak 40 °C'de (24, 48, 72, 96, 120 ve 144 saatlerde), optimum çalkalama hızında çalkalayıcı inkübatöre bırakıldı. Daha sonra β-galaktosidaz aktivite tayini yapıldı.

3.15.2. Sıcaklık

Sıcaklığın β-galaktosidaz üretime etkisinde steril besiyerleri çalkalayıcıda 30°C ve 80 °C'lerde (5 °C'lik artışlarla) optimum çalkalama hızında çalkalayıcı inkübatöre bırakıldı. Daha sonra β-galaktosidaz aktivite tayini yapıldı.

3.15.3. pH

β-galaktosidaz aktivite üzerine pH'nın etkisi için NaOH ve HCl kullanılarak besiyerlerin pH'ları 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 olacak şekilde ayarlandı.. Daha sonra β-galaktosidaz aktivite tayini yapıldı.

3.15.4.Uygun substrat seçimi

Muz, pirinç, arpa, buğday ve mercimek kabukları katı substrat olarak kullanıldı. Substratlardan 3g tartılıp erlenlere konulduktan sonra üzerlerine 10 ml distile su eklendi. 20 dakika 121 °C'de otoklavlandıktan soğutularak sıvı besiyerinden optimum oranda bakteri ekimi yapıldıktan sonra inkübasyona bırakılarak β-galaktosidazın üretimine etki eden substratların etkisi tespit edildi.

3.15.5.Uygun substrat parça büyüklüğünün tespiti

Çapları 500, 1000, 1500 ve 2000 µm olan elekler kullanılarak elde edilen substratlardan 3 g alınıp kapaklı cam şişelere konulup üzerine 10 ml distile su eklendi. 20 dakika 121 °C'de otoklavlandıktan sonra izolat ekimi yapılarak inkübe edildi.

3.15.6. Nem miktarının tespiti

Kapaklı cam şişelere KFF besiyerine hacminin (w/v) % 10, 20, 30, 40, 50, 60 olacak şekilde 1g, 2g, 3g, 4g, 5g ve 6g ağırlığında substrat konularak üzerine 10 ml distile su eklenerek otoklavlandı. Besiyerleri steril edildikten sonra bakteri ekimi yapılarak inkübasyona bırakıldı. Daha sonra β -galaktosidazın üretimine nem miktarının etkisi araştırıldı.

3.15.7.Çalkalama Hızının tespiti

β -galaktosidazın üretimine optimum çalkalama hızının etkisinin tespiti için, sırasıyla 60, 90, 120, 150 ve 180 rpm'de ayarlanan çalkalayıcıya konulan KFF besi ortamına inoküle edilen bakterilerden enzim üretilerek optimum inkübasyon süresi sonunda, çalkalama hızının etkisi enzim aktivitesi ölçülerek belirlendi.

3.15.8.Ekim miktarının tespiti

KFF besi ortamındaki besiyeri hacminin etkisinin tespiti için, sırasıyla % 5, % 10, %15, % 20, % 25, % 30, % 35, % 40, % 45 ve % 50'i olacak şekilde 150 μ l'den 1500 μ l'ye kadar farklı oranlarda izolat ekimi yapıldıktan sonra inkübe edildi. En uygun miktar inkübasyon süresi sonunda enzim aktivitesi ölçülerek belirlendi.

3.15.9.Karbon kaynakları (% 1)

3 g bitkisel atık bulunan besiyerleri hazırlanarak otoklavlandıktan sonra % 1'lik (30 mg) karbon kaynaklarından glikoz, galaktoz, mannoz, ksiloz, fruktoz, sukroz, laktoz ve nişasta kullanılarak β -galaktosidaz üretimine bakıldı.

3.15.10. Azot kaynakları (% 1)

Azot kaynağı olarak maya ekstraktı, amonyum asetat, amonyum sulfat, tripton, glisin, üre ve pepton kullanıldı. Besiyerlerindeki azot kaynaklarının oranı % 1 (30 mg) olarak belirlendi. Azot kaynaklarının β -galaktosidaz üretimi üzerindeki etkisi araştırıldı.

3.15.11. Farklı metal tuzları

KFF besi oratımına farklı metal tuzları CaCl_2 , ZnCl_2 , CdCl_2 , HgCl_2 , CoCl_2 , MgCl_2 ve CuSO_4 son konsantrasyon 2 mM olacak şekilde ayarlanarak otoklavda 121°C 'de 20 dakika steril edilip soğutma işleminden sonra bakteri ekimi yapılarak inkübasyona bırakıldı.

3.15.12.Farklı surfaktanlar

Besiyerine son konsantrasyonu % 0,5 olacak şekilde Tween20, Tween40, Tween80 ve TritonX100 surfaktan olarak eklenerek 121°C 20 dakika boyunca otoklavlanıp, soğuduktan sonra izolat ekimi yapılarak inkübasyona bırakıldı. Süre bitiminde besiyerinden alına üst sıvıdan enzim aktivite tayini yapıldı.

3.15.13.Farklı sıcaklık değerlerinin enzim stabilitesi üzerine etkisi

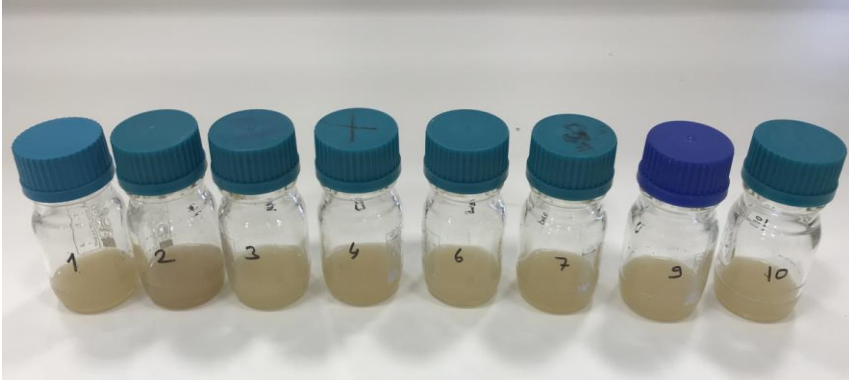
Enzimin termostabilitesi 50, 55, 60, 65, 70, 75 ve 80°C sıcaklıkları kullanılarak 1., 2., 4., 8. ve 12. saat belirtilen sıcaklıklarda ön inkübasyona bırakıldı. Daha sonra normal enzim aktivite tayini yapılarak enzimin termostabilitesi belirlendi.

3.15.14.Farklı pH değerlerinin enzim stabilitesi üzerine etkisi

Enzimin pH stabilitesini belirlemek için farklı pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 ve 10.0'da; 1, 2, 4, 8 ve 12 saat boyunca ön inkübasyona bırakıldı. Daha sonra normal enzim aktivite tayini yapılarak enzimin pHstabilitesi belirlendi.

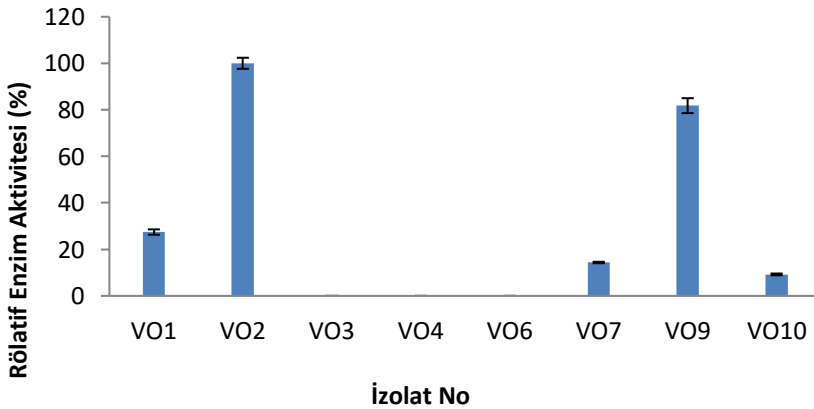
4. BULGULAR

4.1.1. β -galaktosidaz Üretimi İçin Uygun İzolat Seçimi



Şekil 4.1. NB besiyerine ekilen izolatların 48 saatlik kültür görüntüsü

β -galaktosidaz üretimi için NB sıvı besiyerinde yapılan ön çalışma sonuçlarına göre yüksek oranda enzim üretebilme kapasitelerinden dolayı (Rölatif enzim aktivitesi: VO2 % $100 \pm 1,15$, VO9 % $81,79 \pm 3,21$) bu izolatların kullanılmasına karar verildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. β -galaktosidaz üretimi için uygun izolat seçimi

4.1.2.VO2 ve VO9'un Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

Tablo 4,1'de VO2 ve VO9'un fizyolojik, morfolojik ve biyokimyasal özellikleri gösterildiği gibi her iki izolatın gram (+), çubuk şekilli, hareketli oldukları, kazein ve nişastayı hidrolizlediği, lipaz ve katalaz aktivitesini gösterdiği, oksijenli solunum yaptıkları belirlendi. VO2 izolatının subterminal, VO9 izolatının ise sentral spor oluşturduğu belirlendi. VO2'nin optimum büyüme gösterdiği pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla, 7.0 ve 40 °C iken, VO9 için ise pH ve sıcaklık değerleri sırasıyla 6.0 ve 45 °C olarak saptandı.

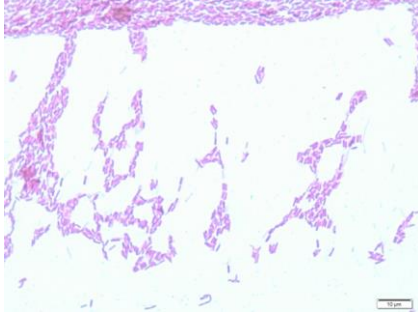
Özellikler	VO2	VO9
Gram Boyama	+	+
Spor Oluşturma	Subterminal	Sentral
Hücre Şekli	Çubuk	Çubuk
Gelişme Sıcaklığı	30-60°C Opt.40°C	30-65°C Opt.45°C
Büyüme pH'sı	5.0-10.0 Opt. 7.0	5.0-10.0 Opt. 6.0
Oksijenli solunum	+	+
Hareket Yeteneği	+	+
Kazein Hidrolizi	+	+
Nişasta Hidrolizi	+	+
Lipaz Aktivitesi	+	+
Katalaz Aktivitesi	+	+

Tablo 4.1. İzolat 2 ve 9'un Morfolojik, Fizyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

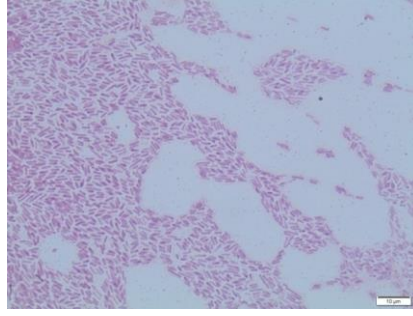
4.1.3.Boyama Testleri

4.1.3.1.Gram boyama

VO2 ve VO9 izolatları gram boyama yapılarak fotoğraflandı. Şekil 4,3'te görüldüğü üzere iki bakteri izolatının da gram pozitif olduğu belirlendi.



B.licheniformis VO2

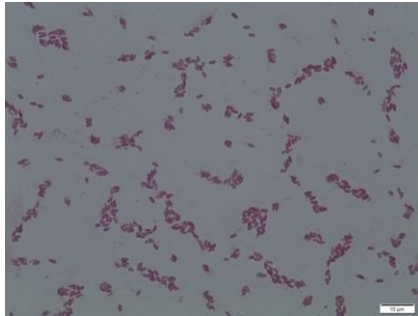


B.licheniformis VO

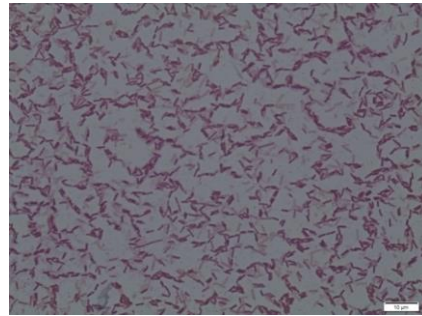
Şekil 4.3.Gram Boyama

4.1.3.2.Spor boyama

VO2 ve VO9 izolatları spor boyama yapılarak fotoğraflandı. Şekil 4.4'te görüldüğü gibi her iki izolatında spor oluşturduğu görüldü.



B.licheniformis VO2

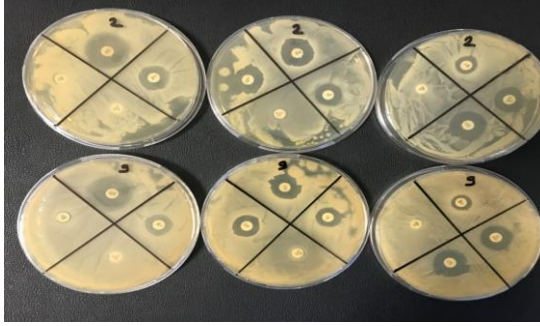


B.licheniformis VO9

Şekil 4.4.Spor Boyama

4.1.3.3.Antibiyotik duyarlılık testi

İki bakteri izolatu için yapılan yapılan antibiyotik duyarlılık testi Şekil 4,5'te fotoğraflanarak belirlendi. Yapılan testin sonuçlarına göre (Tablo 4.2) VO2 ve VO9 izolatları ampicilin, imipenem, aztronam ve fluconazole karşı dirençli olduğu diğer antibiyotiklere duyarlı olduğu belirlendi.



Şekil 4.5. Disk Diffüzyon Antibiyotik Testi

ANTİBİYOTİKLER	VO2	VO9
Amikacin (AK 30)	16 mm	15 mm
Rifamycin (RF 30)	15 mm	14 mm
Tobramycin (TOB 10)	14 mm	13 mm
Nitrofuration (F 100)	12 mm	11 mm
Ampicillin (AM 10)	-	-
Chloramphenicol (C 30)	10 mm	9 mm
Imipenem (IPM 10)	-	-
Rifampin (RA 5)	9 mm	8 mm
Streptomycin (S 10)	15 mm	13 mm
Aztronam (ATM 30)	-	-
Tetracycline (TE 30)	18 mm	16 mm
Fluconazole (FCA 25)	-	-

Dirençli (-)

Tablo 4.2. VO2 ve VO9'un Antibiyotik Test Sonuçları

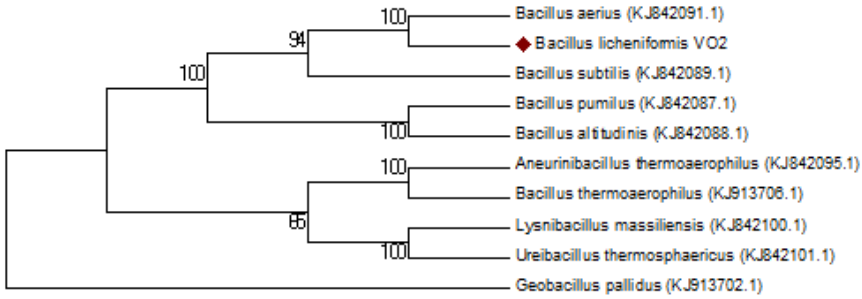
4.1.4. İzolatların İzolasyonu ve 16S rRNA Dizi Analizi

Bitlis Budaklı Kaplıçalardan alınan su ve çamur örneklerinden bakteri izolasyonu gerçekleştirildi. Çamur örnekleri 80 °C'de 10 dk bekletildikten sonra NB besi yerine ekim yapıldı. Birkaç kez alt kültüre alınarak saflaştırılan İzolatlar İTÜ Teknokent İONTEK Laboratuvarlarına gönderilerek dizi analizleri yapıldı. Her iki izolatın diğer *Bacillus* türleriyle olan evrimsel ilişkileri Şekil 4.6'da gösterildi.

VO2

CGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGG
GGCTAATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATCATAAAA
GGTGGCTTTTtagctaccacttaccgatggaccCGCGGCGCAATAGC
TAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACCATTCTGTAGCCGA
CCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAA
GTCTGACGGAACAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGATCG
TAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGC
GGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG
CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATT
ATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCCGTTTCTTAAGTCTGATGTGAA
AGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTT
GAGTGCAGAAGAAGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATG
CCTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCCACTCTCTGGT
CTGTAACTGACGCTGAAGCGCAAAGCCTGGGGAGCCAACAGGAT
TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT
AGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGNCAACGCATTAAGCACTC
CGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGAC
GGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAA
CGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAG
ATAGGGCTTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTT
GTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAG
CGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAG
GTGACCTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA

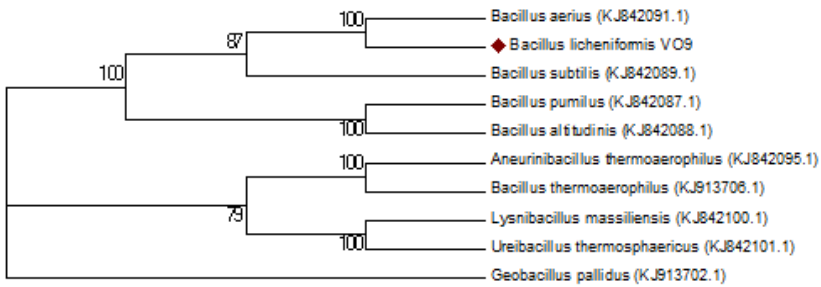
ATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGG
CAGAACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCCACA
AATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAA
GCTGGAATCGTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATAC
GTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACGACGAGAGTTTGT
AACACCCGAAG



VO9

ATAGCGTCGGAGCAGCGGCGGATAGTGACAGTCGAGCGGACGATG
GGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGCCTTAGTAACACGTG
GGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCT
AATACCGGATGCTTGATTGAACCGCATGGTTCAATTATAAAAGGTG
GCTTTTAGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGT
TGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCAACCTG
AGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCT
GACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCCGATCGTAAA
ACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCGAATAGGGCGGTA
CCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTG
GGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGC
CCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAG

TGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGT
 AGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTG
 TAACTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAG
 ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAG
 AGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCG
 CCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGG
 GGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACG
 CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCCTAGAGAT
 AGGGCTTCCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGT
 CGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCG
 CAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAAGTTGGGCACTCTAAGGT
 GACCTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAT
 CATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGCA
 GAACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCCACAAA
 TCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGC
 TGGAATAGCTAGTAATAAGCGGATCAGCATGCAACGGTGTATACG
 TTCCCGGGCCTAGTACACACCGCCCGTCTATCGGAGAGAGTTTGAA
 CACCCGAAGAAGGAGAGGAAACCAATGGAGCCTGCTTGATATTGC
 AGTCTACACGGCCCCTGCTTT

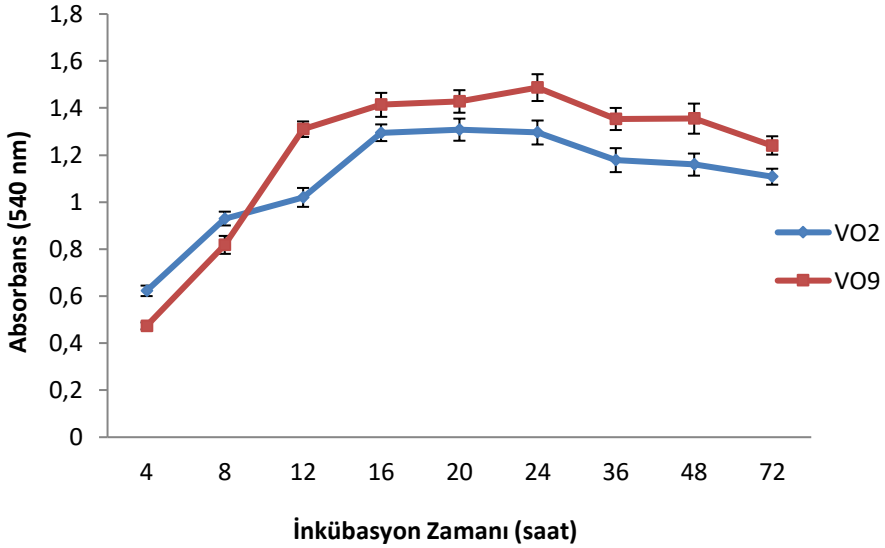


Şekil 4.6. İzolat VO2 ve VO9 'un yakın türler ile dendrogram gösterimi

4.1.5. Mikroorganizmaların Uygun Büyüme Ortamlarının Tespiti

4.1.5.1. İnkübasyon Süresinin Mikroorganizmaların Gelişimi Üzerine Etkisinin Araştırılması

İzolatlar farklı inkübasyon zamanlarında (4, 8, 12, 16, 20, 24, 36, 48 ve 72 saatler) kültüre alınarak zamana bağlı üremeleri araştırıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.7’te olduğu gibi VO2 izolatının en uygun inkübasyon süresinin 20. saat olduğu belirlendi. VO9 izolatının uygun inkübasyon süresi ise 24. saat olduğu görüldü.

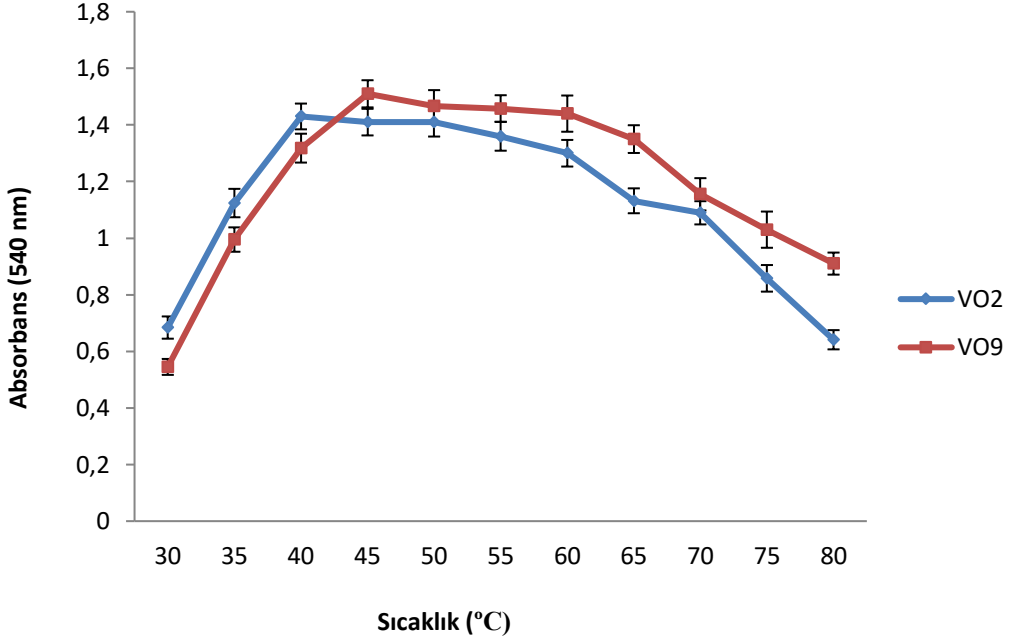


Şekil 4.7. İnkübasyon süresinin izolatların üremesi üzerine etkisi

4.1.5.2. Sıcaklığın Mikroorganizmaların Gelişimi Üzerine Etkisinin Araştırılması

Mikroorganizmanın üremesi üzerine farklı sıcaklık değerlerinin (30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 ve 80 °C) etkileri araştırıldı. Şekil 4.8’de görüldüğü gibi

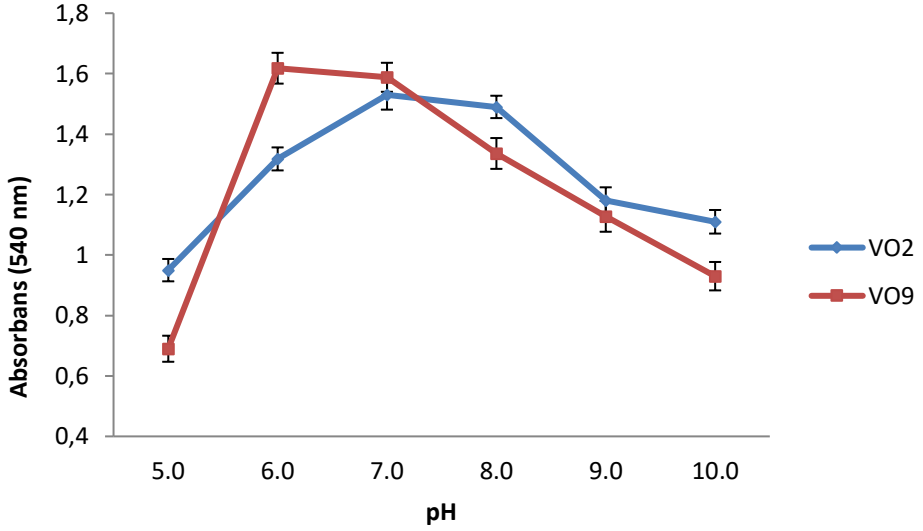
VO2 izolatının optimum üreme sıcaklığı 40 °C, VO9 izolatı için optimum üreme sıcaklığı 45 °C olarak belirlendi.



Şekil 4.8.Sıcaklığın izolatların üremesi üzerine etkisi

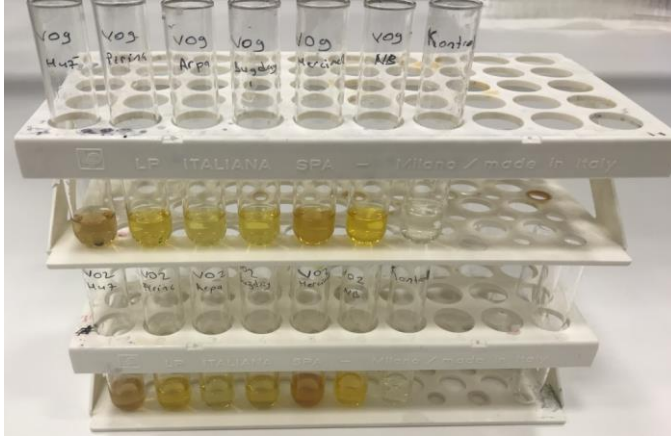
4.1.5.3.pH'nın Mikroorganizmaların Gelişimi Üzerine Etkisinin Araştırılması

Bakteri üretimi üzerine farklı pH değerleri (5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 ve 10.0) araştırıldı. Şekil 4.9'de görüldüğü gibi VO2 izolatı için optimum üreme pH'sı 7.0 iken VO9 izolatı için ise pH 6.0 olarak tespit edildi.



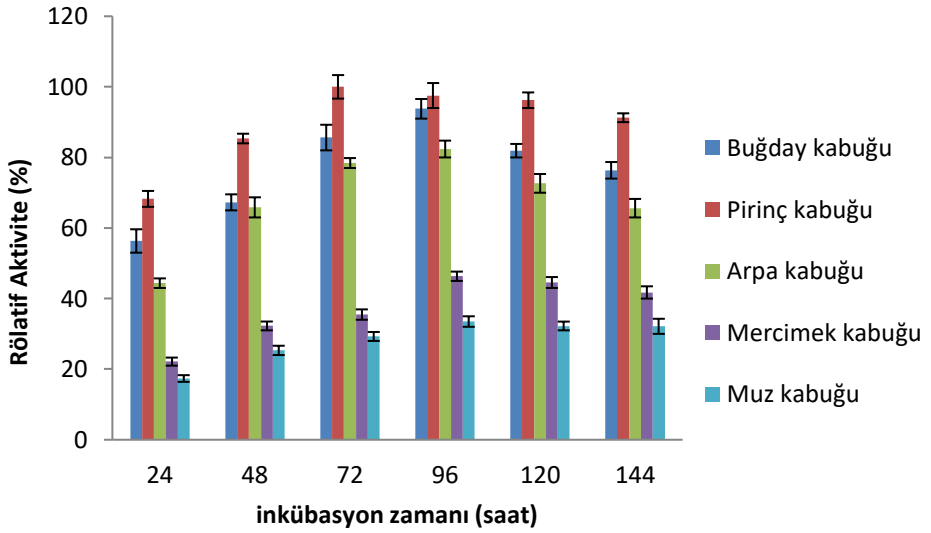
Şekil 4.9.pH'nın izolatların üremesi üzerine etkisi

4.1.6.Uygun Substrat Seçimi

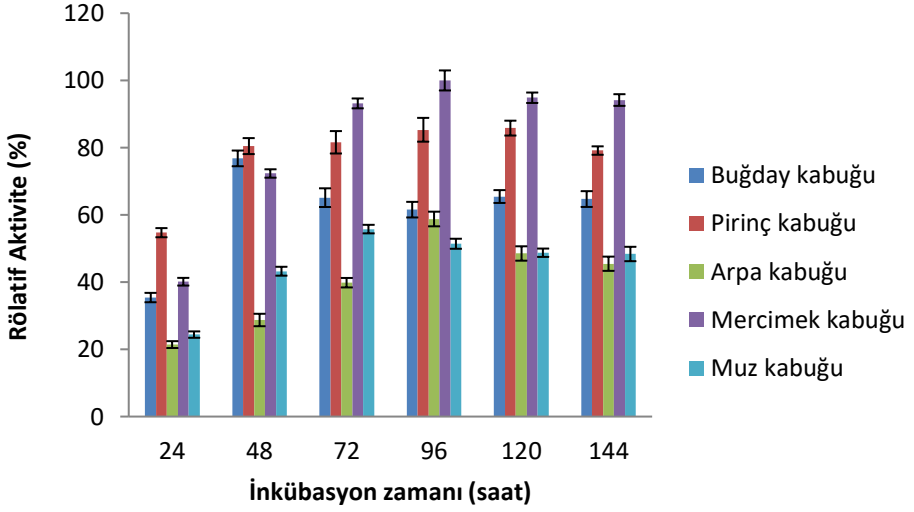


Şekil 4.10.VO2 ve VO9'un farklı katı besiyerlerindeki β -galaktosidaz aktivitesi (Sıcaklık: 45 °C, pH: 7.0, inkübasyon süresi: 72 saat, substrat büyüklüğü: 1000 μ m)

1000 μm parça büyüklüğündeki muz, pirinç, arpa, buğday ve mercimek kabukları katı substrat olarak kullanıldı. VO2 ve VO9 izolatlarının ekimi yapıldıktan sonra çalkalamalı su banyosunda 37 °C’de 24-144. saatleri arasında enzim aktivite tayini yapıldı. En yüksek rölatif enzim aktivitesi VO2 için 72. saatte pirinç kabuğunda ve VO9 için 96. saatte mercimek kabuğunda tespit edildi (Şekil 4.11 ve 4.12).



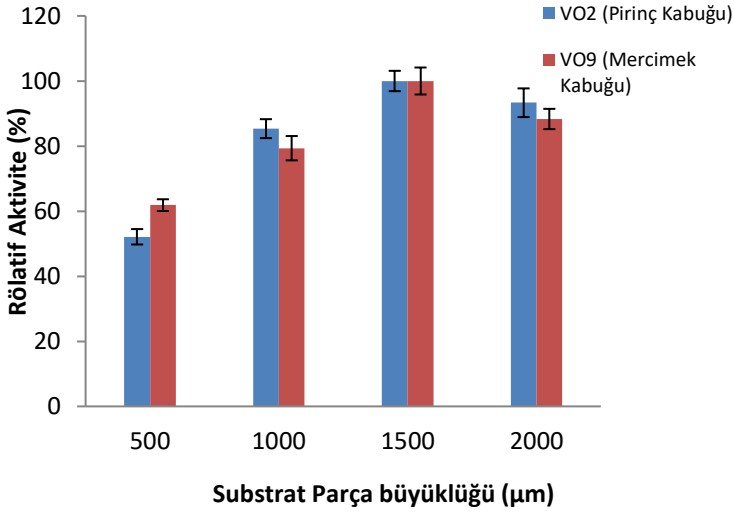
Şekil 4.11.VO2’de β -galaktosidaz üretimi için uygun substrat seçimi



Şekil 4.12.VO9'da β -galaktosidaz üretimi için uygun substrat seçimi

4.1.7.Uygun Substrat Parça Büyüklüğünün Tespit Edilmesi

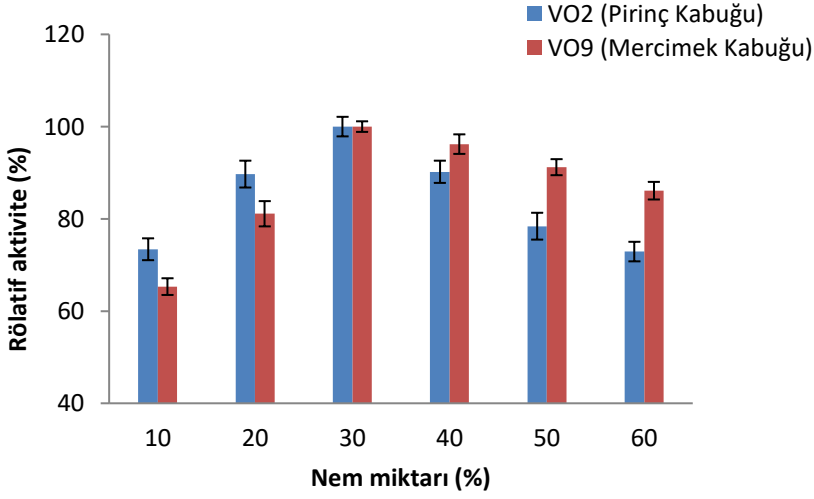
VO2 için pirinç kabuğu ve VO9 için mercimek kabuğunun uygun parça büyüklüğünü tespit etmek amacıyla farklı çap büyüklüğünde (500, 1000, 1500 ve 2000 μ m) elekler kullanıldı. VO2 ve VO9 izolatlarından enzim üretimi için en uygun substrat büyüklüğünün 1500 μ m olduğu tespit edildi (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. β -galaktosidaz üretimi için uygun substrat büyüklüğünün tespit edilmesi

4.1.8. Uygun Substrat ve Nem Miktarının Tespiti

VO2 ve VO9 izolatlarından enzim üretimi için uygun nem miktarının tespiti için: KFF besiyerine hacminin (w/v) % 10, 20, 30, 40, 50, 60 olacak şekilde 1g, 2g, 3g, 4g, 5g ve 6 g ağırlığında substrat konularak üzerine 10 ml distile su eklenerek otoklavlandı. VO2 izolatı için substrat olarak pirinç kabuğu, VO9 izolatı için mercimek kabuğu kullanıldı. Şekil 4.14'te görüldüğü gibi VO2 ve VO9 izolatları için optimum nem miktarı % 30 olarak tespit edildi.

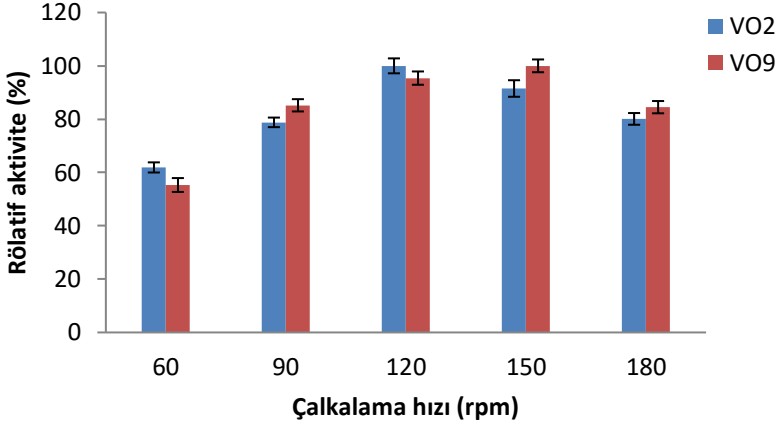


Şekil 4.14. β -galaktosidaz üretimi için uygun nem miktarı

4.1.9.Uygun Çalkalama Hızının Tespiti

β -galaktosidazın üretimine etki eden optimum çalkalama hızını tespit etmek için, KFF besiyerleri sırasıyla 60, 90, 120, 150 ve 180 rpm’de çalkalayıcı inkübatöre bırakıldı. Şekil 4.15’te görüldüğü gibi VO2 izolatında 60 rpm’den 120 rpm’e kadar enzim üretiminde artış olduğu, 120 rpm çalkalama hızında maksimum düzeyde enzim üretimi olduğu tespit edildi. 120’den daha yüksek hızlarda enzim üretiminin azaldığı saptandı.

VO9 izolatında ise 60 rpm’den 150 rpm’e kadar enzim üretiminde artış olduğu 150 rpm’de maksimum düzeyde enzim üretildiği tespit edildi. 180 rpm’de enzim üretiminin azaldığı gözlemlendi.



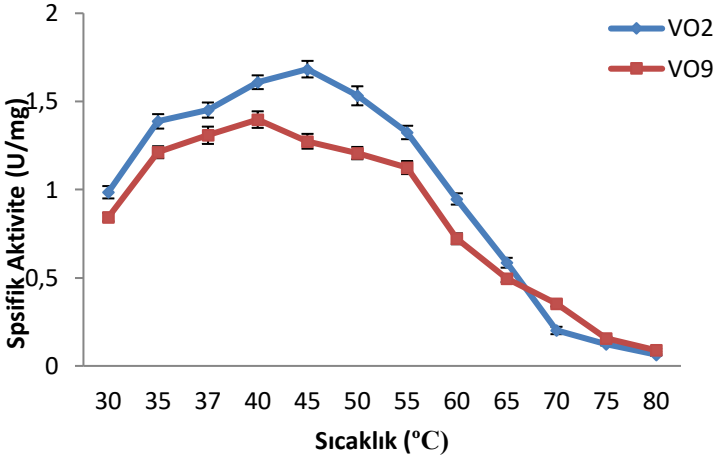
Şekil 4.15. β -galaktosidaz üretimi için uygun çalkalama hızı

4.1.10. Sıcaklığın 2 ve 9 nolu İzolatlarda β -galaktosidaz Üretimi Üzerine Etkisi

Enzim üretimi üzerine farklı sıcaklık değerlerinin (30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 ve 80 °C) etkileri incelendi. Sonuçlar Şekil 4.16'da gösterildiği gibi, VO2 izolatu sıcaklığın artışına bağlı olarak 45 °C'de $1,678 \pm 0,047$ U/mg en yüksek seviyede üretim gösterdi. Optimum sıcaklığı 45 °C olarak belirlendi. 45 °C'den sonra belirgin olarak düşüşler saptandı.

VO9 izolatu için optimum sıcaklık seviyesi olarakta 40 °C gözlemlendi. VO9 izolatının 40 °C'deki aktivitesi $1,397 \pm 0,055$ U/mg olarak en yüksek değer olarak belirlendi.

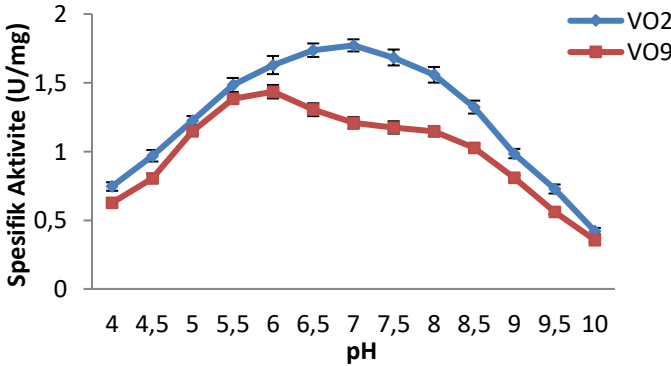
VO2 izolatu için 45 °C'den sonra ve VO9 izolatu için ise 40 °C'den sonra sıcaklığın artışıyla enzim aktivitesinin azalması bakteri üretimindeki azalmaya bağlanabilir.



Şekil 4.16. Sıcaklığın 2 ve 9 nolu izolatlarda β-galaktosidaz üretimi üzerine etkisi

4.1.11. pH'nın 2 ve 9 nolu İzolatlarda β-galaktosidaz Üretimi Üzerine Etkisi

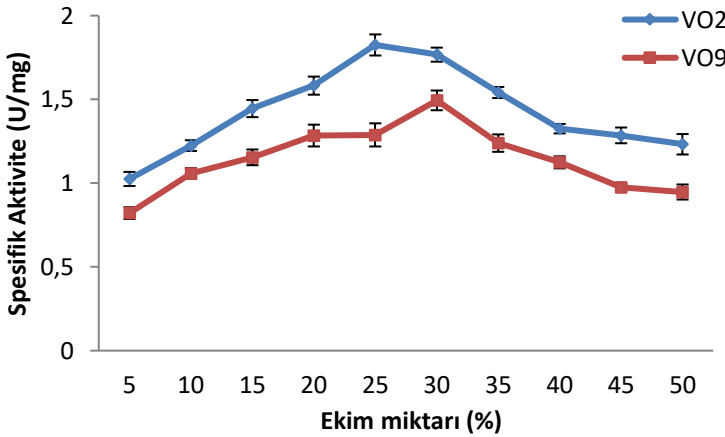
Enzim üretimi üzerine farklı pH değerlerinin (4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5 ve 10.0) etkileri incelendi. Şekil 4, 17'de görüldüğü gibi VO2 izolatının enzim üretimi için optimum pH değeri 7.0 ($1,791 \pm 0,044$ U/mg) iken VO9 izolatı için ise optimum pH değeri 6.0 ($1,435 \pm 0,049$ U/mg) olarak saptandı.



Şekil 4.17. pH'nın 2 ve 9 nolu izolatlarda β-galaktosidaz üretimi üzerine etkisi

4.1.12. Ekim Miktarının 2 ve 9 nolu İzolatlarda β -galaktosidaz Üretimi Üzerine Etkisi

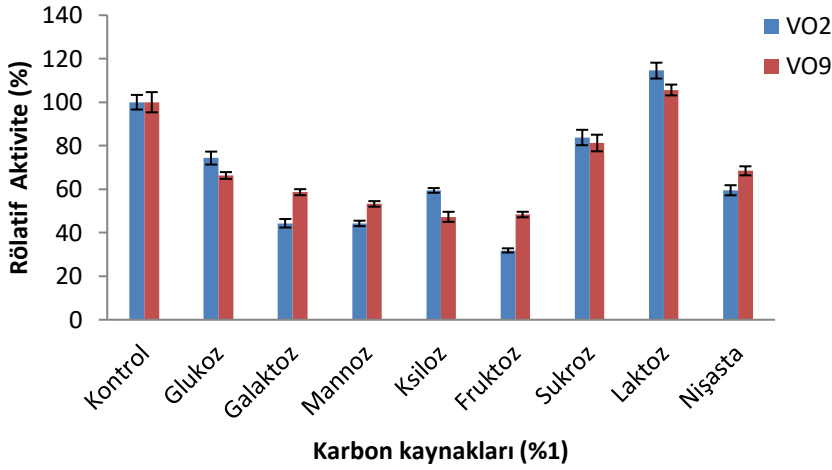
Farklı ekim miktarlarının (% 5, % 10, % 15, % 20, % 25, % 30, % 35, % 40, % 45 ve % 50) β -galaktosidaz üretimi üzerine etkisi şekil 4,18’de görülmektedir. VO2 izolatu için optimum ekim miktarının % 25 ($1,816 \pm 0,063$ U/mg) olduğu, VO9 izolatında ise ekim miktarı % 30 ($1,494 \pm 0,056$ U/mg) olarak tespit edildi.



Şekil 4.18. Ekim miktarının 2 ve 9 nolu izolatlarda β -galaktosidaz üretimi üzerine etkisi

4.1.13. Farklı Karbon Kaynaklarının 2 ve 9 nolu İzolatlarda β -galaktosidaz Üretimi Üzerine Etkisi

% 1 oranında KFF ortamına eklenen karbon kaynaklarının (glukoz, galaktoz, mannoz, ksiloz, fruktoz, sukroz, laktoz ve nişasta) β -galaktosidaz üretimine olan etkisi araştırıldı. Şekil 4.19’da görüldüğü gibi en yüksek enzim üretimi VO2 izolatu için % $114,5 \pm 2,85$ ve VO9 izolatu için ise % $105,3 \pm 3,15$ olarak laktozda görüldü. Her iki izolatta da en düşük enzim üretimi ilave olarak besiyerine eklenen fruktozlu ortamda gözlemlendi.

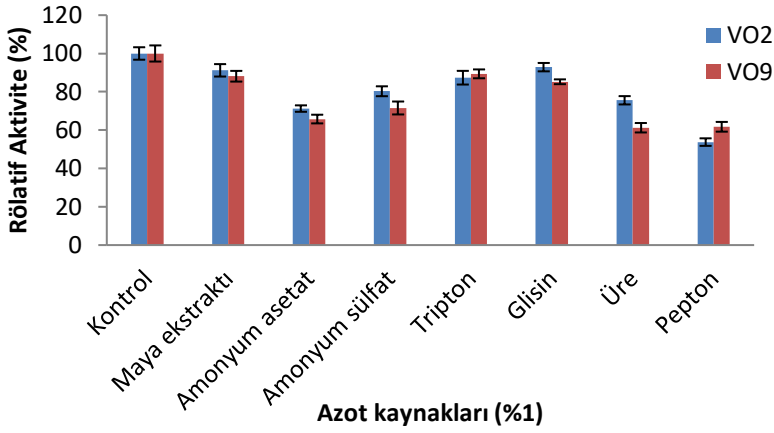


Şekil 4.19.Farklı karbon kaynaklarında β-galaktosidaz üretimi

4.1.14.Farklı Azot Kaynaklarının 2 ve 9 nolu İzolatlarda β-galaktosidaz Üretimi Üzerine Etkisi

% 1 oranında KFF ortamına eklenen farklı azot kaynaklarının (maya ekstraktı, amonyum asetat, amonyum sulfat, tripton, glisin, üre ve pepton) β-galaktosidaz üretimi üzerine etkisi araştırıldı. Şekil 4,20'de görüldüğü gibi çalışılan her iki bakteride de eklenen azot kaynaklarının, enzim üretiminde kontrole göre düşük olduğu tespit edildi. VO2 izolatının ilave azot kaynağı olarak kullandığı glisin % $92,8 \pm 2,19$ enzim üretiminde diğer azot kaynaklarına göre olumlu yönde etkili olduğu, pepton olarak kullanılan ilave azot kaynağında ise diğer azot kaynaklarına göre en düşük seviyede % $53,7 \pm 1,97$ enzim ürettiği gözlemlendi.

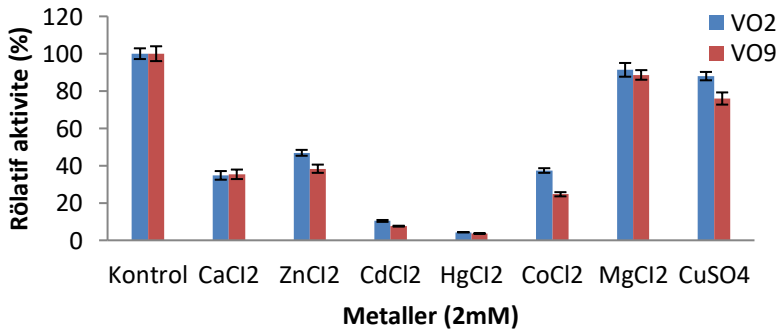
VO9 izolatı için kullanılan ilave azot kaynakları bakımından triptonlu ortamdan (% $89,3 \pm 2,31$) maksimum düzeyde enzim üretiminin olduğu, üre olarak kullanılan azot kaynağında ise (% $61,2 \pm 2,47$) enzim üretiminin diğer azot kaynaklarına göre düşük düzeyde kaldığı belirlendi.



Şekil 4.20.Farklı azot kaynaklarında β -galaktosidaz üretimi

4.1.15.Farklı Metal Tuzlarının 2 ve 9 nolu İzolatlarda β -galaktosidaz Üretimi Üzerine Etkisi

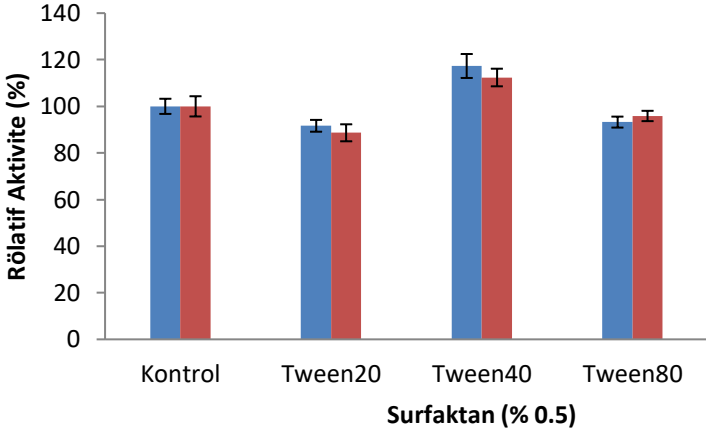
β -galaktosidaz üretimi üzerine farklı metal tuzlarının (CaCl_2 , ZnCl_2 , CdCl_2 , HgCl_2 , CoCl_2 , MgCl_2 ve CuSO_4) etkisi araştırıldı. Şekil 4.21'de görüldüğü gibi MgCl_2 ilave edilen ortamda VO2 izolatu % $91,3 \pm 3,68$, VO9 izolatu ise % $84,3 \pm 3,68$ rölative enzim aktivitesi gösterdi. Her iki izolatta da CdCl_2 , HgCl_2 , CoCl_2 ve CaCl_2 eklenen ortamda enzim üretiminde önemli oranda azalma meydana geldiği tespit edildi.



Şekil 4.21.Farklı metal tuzlarının β -galaktosidaz üretimine etkisi

4.1.16.Farklı Sürfaktanların β -galaktosidaz Üretimi Üzerine Etkisi

Besiyerlerine eklenen surfaktanların (Tween20, Tween40, Tween80 ve TritonX100) β -galaktosidaz üretimi üzerine etkisi çalışılmış olup şekil 4.22’de görüldüğü gibi VO2 izolatının β -galaktosidaz üretimi TritonX100’de % 131,7 \pm 3.65 olduğu tespit edildi. VO9 izolatı için β -galaktosidaz üretimi için kullanılan surfaktanlardan Tritonx100’de % 122,8 \pm 2,98 artışla en iyi etkiyi göstermiştir. Surfaktanların hücre yüzeyini genişletici etkisi ve hücre porlarının daha fazla açılmasına neden olmasıyla üretilen enzimlerin hücre dışına çıkmasına sebep olduğu için enzim üretimindeki artış açıklanabilir.



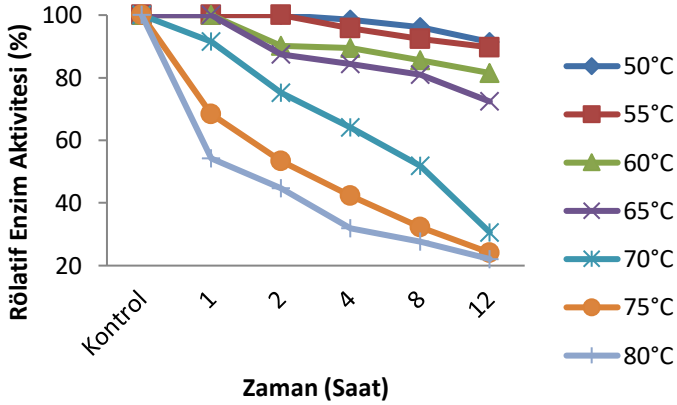
Şekil 4.22.Farklı surfaktanlarda β -galaktosidaz üretimi

4.1.17.Farklı Sıcaklık Değerlerinin Zamana Bağlı Olarak β -galaktosidaz Stabilitesi Üzerine Etkisi

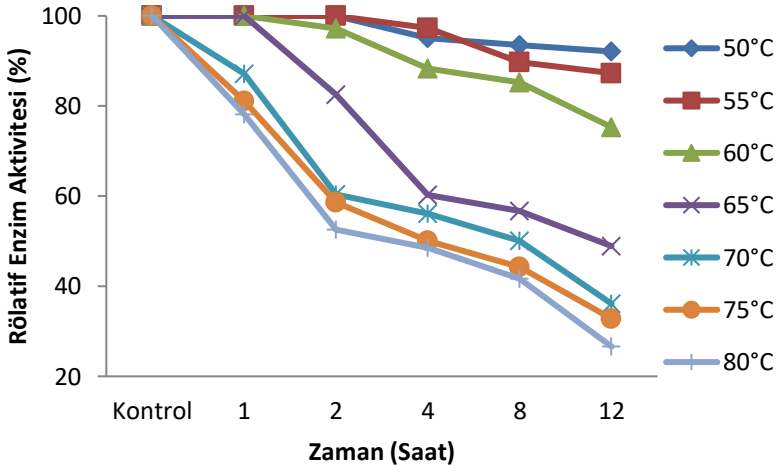
β -galaktosidazın sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi için ham enzim 50, 55, 60, 65, 70, 75 ve 80 °C de farklı sürelerde (1, 2, 4, 8 ve 12 saat) ön inkübasyona bırakıldıktan sonra standart β -galaktosidaz aktivite tayini yapıldı.

Şekil 4.23 ve Şekil 4.24’te görüldüğü üzere VO2 ve VO9 izolatlarından elde edilen enzimin farklı sıcaklıktaki stabiliteyi incelendiğinde, her iki izolatın 50 ve 65 °C’de 1saatlik süre boyunca, 50 ve 55 °C’de ise 2 saat boyunca ön

inkübasyona bırakıldıktan sonra aktivitenin % 100 oranında korunduğu tespit edildi. 65°C’de 4 ve 12 saat ön inkübasyona bırakılan β -Galaktosidaz VO2 için aktivitesini sırasıyla %84 ve %72 oranında korurken, VO9 tarafından üretilen enzimin ise aynı koşullarda aktivitesini %60 ve %48 oranında koruduğu gözlemlendi



Şekil 4.23.VO2 izolatına ait β -galaktosidaz’ın zamana bağlı sıcaklık stabilitesi



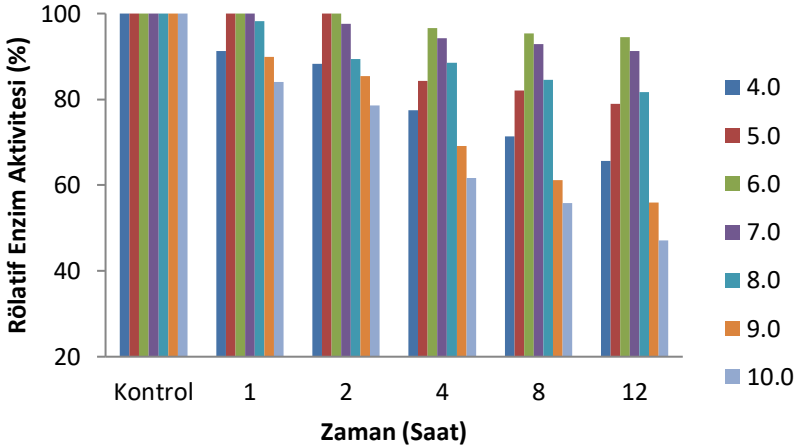
Şekil 4.24.VO9 izolatına ait β -galaktosidaz’ın zamana bağlı sıcaklık stabilitesi

4.1.18.Farklı pH Değerlerinin Zamana Bağlı olarak β-galaktosidaz Stabilitesi Üzerine Etkisi

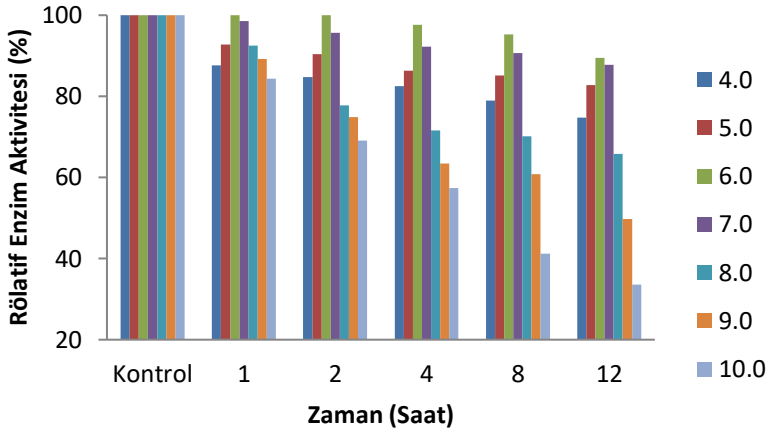
β-galaktosidazın pH stabilitesinin belirlenmesi için ham enzim 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 ve 10.0’da farklı sürelerde (1, 2, 4, 8 ve 12 saat) ön inkübasyona bırakıldıktan sonra standart β-galaktosidaz aktivite tayini yapıldı.

VO2 izolatu pH 5.0, 6.0 ve 7.0’da 1 saat boyunca, pH 5.0 ve 6.0’da 2 saatlik ön inkübasyon süresi sonunda enzim aktivitesini % 100 oranında koruduğu tespit edildi (Şekil 4.25).

VO9 izolatu pH 6,0’da 1 saat boyunca, pH 6,0’da 2 saatlik ön inkübasyon süresi sonunda enzim aktivitesinin % 100 oranında koruduğu, 4, 8 ve 12 saat ön inkübasyon sonunda enzim aktivitesinin kontrole göre kademeli olarak düştüğü tespit edildi (Şekil 4.26).



Şekil 4.25.VO2 izolatına ait β-galaktosidaz’ın zamana bağlı pH stabilitesi



Şekil 4.26.VO9 izolatına ait β -galaktosidaz'ın zamana bağlı pH stabilitesi

5.TARTIŞMA VE ÖNERİLER

5.1.Tartışma

Farklı alanlarda büyük bir gelişme gösteren biyoteknoloji nerdeyse her alanda kullanılmasıyla büyük ilgi görmektedir. Özellikle son yıllarda biyoteknolojik imkanlar kullanılarak mikroorganizmalardan elde edilen enzimlerin endüstriyel alanda yer alması ekonomik yönden ilgi odağı olmuştur (Kıran ve ark., 2006).

Endüstriyel biyoteknolojideki ilerlemelere bağlı olarak kullanılan bir yöntem olan katı faz fermantasyon (KFF) teknolojisinin uygulanması, birçok tarımsal ya da endüstriyel atıkların mikrobiyal yönden substrat olarak kullanılmasıyla ekonomik açıdan büyük bir fırsat sunmaktadır (Pandey ve ark., 2000).

Çalışmamızda farklı sıcaklık değerlerinin (30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 ve 80 °C) enzim üretimine etkisi incelendi. VO2 izolatının 45 °C'de (1,678±0.047 U/mg) optimum enzim üretimi sağladığı, VO9 izolatı için optimum sıcaklık değeri ise 40 °C (1,397±0,055 U/mg) olarak gözlemlendi. VO2 izolatı 30 °C den 45 °C sıcaklığa kadar enzim üretiminde artış gözlemlendiği bu değerden sonra da enzim üretiminde azalma olduğu gözlemlendi. VO9 izolatında ise 30 °C den 40 °C sıcaklığa kadar artış gözlemlendiği 40 °C den sonra sıcaklığa bağlı olarak enzim üretiminde azalma görülmüştür. Her iki bakterinin belli sıcaklıktan sonra enzim üretiminde azalma olmasının nedeninin sıcaklıkla birlikte bakteri üretiminin azalması ve hayati öneme sahip bazı bakteriyel enzimlerin yüksek sıcaklıktan olumsuz etkilenmesi olabilir.

Sridevi ve ark. (2008), katı faz fermantasyon (KFF) yöntemiyle *Aspergillus oryzae* mantarından elde ettikleri β-galaktosidazın optimum sıcaklığını 30 °C olarak saptamışlardır. Rajoke ve ark. (2003), *Kluyveromyces marxianus*'u kullanarak elde ettikleri β-galaktosidazın optimum sıcaklığını 35-37 °C belirlemişlerdir. Hsu ve ark. (2005), *Bifidobacterium longum* CCRC 15708 kullanarak ürettikleri β-galaktosidazın optimum sıcaklığı 37 °C olarak tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda pH değerlerinin enzim üretimine olan etkisine bakılmıştır. VO2 ve VO9 izolatları için farklı pH aralıkları (4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5,

8.0, 8.5, 9.0, 9.5 ve 10.0) test edilmiştir. VO2 izolatu için optimum pH 7.0 (1.791 ± 0.044 U/mg) olarak, VO9 izolatu için ise optimum pH 6.0 (1.435 ± 0.049 U/mg) olarak tespit edilmiştir.

Hsu ve ark. (2005), *Bifidobacterium longum*'a bağılı üretilen β -galaktosidazın pH aralığını 6.5 olarak tespit etmişlerdir. Batra ve ark. (2002), termofilik bir bakteri olan *Bacillus coagulans* RCS3'dan elde edilen β -galaktosidazın ideal pH aralığı 6.0-7.0 olarak belirlemişlerdir. Itoh ve ark. (1993), *Lactobacillus kefiranofaciens*'den üretilen β -galaktosidazın optimum pH'yı 6.5 olarak saptamışlardır. Elde ettiğimiz sonuçlar araştırmacıların rapor ettikleri sonuçlarla örtüşmektedir.

Çalışmamızda farklı ekim miktarlarının (%5, %10, %15, %20, %25, %30, %35, %40, %45 ve %50) β -galaktosidaz üretimine olan etkisinde VO2 izolatu için optimum ekim miktarı %25 (1.816 ± 0.063 U/mg) olarak tespit edilmiştir. VO9 izolatu için ise ideal ekim miktarı %30 (1.494 ± 0.056 U/mg) olarak tespit edilmiştir. Ekim miktarının yüksek olması bakterinin bulunduğu ortamın nem oranının artmasına ve sıvı bir ortamın oluşması sonucunda difüzyon hızının yavaşlamasına neden olabilir.

Çalışmamızda nem miktarının ve çalkalama hızının enzim üretimine olan etkisinde VO2 ve VO9 izolatları için uygun nem miktarı %30 olarak tespit edilmiştir. Nem miktarının artmasıyla enzim üretiminde düşüşler saptanmıştır. Bu nedenle nem miktarının artması her iki izolat için uygun ortam olmadığı, substratın çözünme oranını değiştirdiğini, difüzyon hızının değişmesine bağlanmaktadır. Çalkalama hızında VO2 izolatu 120 rpm'de, VO2 izolatu ise 150 rpm'de maksimum düzeyde enzim üretimi tespit edilmiştir. Her iki izolatın optimum çalkalama hızından sonra enzim üretiminde düşüş göstermesi uygun olmayan ortam şartların oluşması, besin miktarının azalmasına olarak düşünülmektedir.

Çalışmamızda %1 oranında ortama eklenen farklı karbon kaynaklarının (glikoz, galaktoz, mannoz, ksiloz, fruktoz, sukroz, laktoz ve nişasta) β -galaktosidaz üretimine olan etkisinde VO2 izolatu için sırasıyla laktoz > sukroz > glikoz > nişasta > galaktoz > ksiloz > mannoz > froktoz şeklinde bir sıralama belirlenmiştir. VO9 izolatu için enzim üretimindeki sıralama laktoz > sukroz

>glikoz> nişasta > ksiloz > galaktoz > mannoz > froktoz şeklindedir. Her iki izolat için laktoz enzim üretmede maksimum düzeyde bir verim sağlarken, fruktoz ise her iki izolat için olumsuz etki oluşturarak minimum düzeyde enzim üretilmesine neden olmuştur.

Sridevi ve ark. (2008), kat faz fermantasyon (KFF) yöntemiyle *Aspergillus oryzae* mantarından elde etikleri β-galaktosidaz üretiminde % 1 oranında eklenen dört farklı karbon kaynağında en iyi enzim üretimi glikozda gözlemişlerdir. Konsula ve ark. (2007), yaptıkları çalışmalarda *Bacillus subtilis*'den β-galaktosidaz enzim üretmiş olup enzim üretimi için kullandıkları karbon kaynakları içinde en iyi enzim üretimi galaktosidazda olduğunu bildirmişlerdir. Rajoke ve ark. (2003), yaptıkları çalışmalarda enzim üretimi için en karbon kaynağı olarak laktozda, en düşük enzim üretiminde glikozda tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda % 1 oranında ortama eklenen farklı azot kaynaklarının (maya ekstraktı, amonyum asetat, amonyum sulfat, tripton, glisin, üre ve pepton) β-galaktosidaz üretimine etkisine bakıldığında VO2 izolatu glisin > maya ekstratu > tripton > amonyum sulfat > amonyum asetat > üre şeklinde bir sıra izleyerek en iyi üretimin glisin eklenen ortamda gözlenmiştir. VO9 izolatu ise tripton > maya ekstraktı > glisin > amonyum sulfat > amonyum asetat > pepton > üre olarak elde edilmiştir. Sonuçlardan görüldüğü gibi en iyi azot kaynağı tripton olarak saptanmıştır.

Sridevi ve ark. (2008), yaptıkları çalışmalarda kullanılan azot kaynakları içinde maksimum düzeyde enzim üretimi sodyum nitratta gözlemişlerdir. Konsula ve ark. (2007), *Bacillus subtilis* 'i kullanarak yaptıkları çalışmalarda azot kaynağı olarak kullanılan maya ekstraktı en yüksek aktiviteyi gösterdiğini belirlemişlerdir. Hsa ve ark. (2005), yaptıkları çalışmada, en yüksek β-galaktosidaz seviyesinin, azot kaynakları için maya özütü ile üretildiğini saptamışlardır. Çalışılan her iki bakteride de eklenen azot kaynaklarının, enzim üretiminde kontrole göre düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçta enzim üretimi için dışarıdan azot kaynağı eklenmesinin gerekli olmadığını ve daha düşük maliyetle üretim yapabileceğimizi göstermektedir. Yaptığımız çalışmada maya ekstraktının her iki izolat için de iyi bir ek azot kaynağı olduğu

belirlenmiştir. Ancak en yüksek enzim üretimi VO2 için glisin, VO9 için tripton olarak gözlenmiştir.

Çalışmamızda farklı metal tuzlarının (CaCl_2 , Zn Cl_2 , CdCl_2 , HgCl_2 , CoCl_2 , MgCl_2 ve CuSO_4) enzim üretimine olan etkisini belirlemek için yedi farklı metal iyonu kullanılmıştır. VO2 için en iyi enzim üretimi MgCl_2 metal iyonunda göstermiş olup kontrole göre düşük bir oranda (%10,8) düşüş olduğu tespit edildi. HgCl_2 'nin ise % 93 oranında enzim üretimini inhibe ettiği belirlenmiştir. VO9 izolatında ise optimum enzim üretimi MgCl_2 metal iyonunda gözlenmiş olup kontrole göre % 12,3 oranında bir düşüş olmuştur. En düşük enzim üretimi oranı HgCl_2 içeren ortamda tespit edilmiş olup bu ağır metalin enzim üretimini inhibe ettiği açıkça görülmüştür.

Isık ve ark. (2010), *S. thermophilus* ve *L. bulgaricus*'den üretilen β -galaktosidaz için Mg^{+2} iyonları aktivasyon artırıcı bir etki yarattırken. Zn^2 , Ca^2 ve Fe^2 metal iyonları aktiviteyi inhibe edici etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Lu ve ark. (2007), yaptıkları çalışmada Mg^{+2} enzim üretimini aktive ederken Hg^{+2} ve Cu^{+2} iyonları ise aktiviteyi inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Chakraborti ve ark. (2000), metal iyonların enzim aktivasyonu üzerine yaptıkları çalışmalarda Mg^{+2} iyonunu optimum bir aktivatör olduğunu saptamışlardır. Wanarska ve ark. (2005), yapmış oldukları çalışmada Mg^{+2} iyonunun aktiviteyi olumlu yönde etkilediği Cu^{+2} enzim aktivitesine etkisinin olmadığı ama ağır metal iyonlarının aktiviteyi inhibe ettiğini tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda surfaktanların (Tween20, Tween40, Tween80 ve Triton X-100) β -galaktosidaz üretimi üzerine etkisinde VO2 ve VO9 izolatları için maksimum düzeyde enzim üretme büyüklükleri Triton X-100 > Tween40 > Tween80 > Tween20 şeklinde belirlenlenmiştir. Surfaktanların hücre yüzeyi genişletici etkisi ve hücre porlarının genişletmesine neden olmasıyla üretilen enzimlerin hücre dışına çıkmasına sebep olur. Ortamda artan enzim miktarının hücre yüzeyindeki porların genişlemesine bağlanması yanlış olmaz. Bu sonuçlardan Triton X-100 ortama eklendiğinde por genişlemesinin maksimum düzeyde olduğunu, Tween20'de ise porların genişleme oranının minimum düzeyde olduğunu göstermektedir.

β -galaktosidazın sıcaklık stabilitesinin belirlenmesi çalışmalarında 65 °C’de 1 saat ve 55 °C’de 2 saat inkübasyon sonunda her iki izolatın enzim stabilitesinin de % 100 olduğu belirlenmiştir. Her iki izolatın sıcaklığa ve zamanın artmasına bağlı olarak 12 saat sonunda ve 80 °C’da enzim aktivitesinde yaklaşık olarak %75 oranında kayıp görülmesine rağmen enzim aktivitesini tamamen yitirmediği tespit edilmiştir. Bu sonuç elde edilen enzimin endüstriyel alanda yüksek sıcaklık gerektiren işlemlerde kullanılmasının önemini göstermektedir.

Chakraborti ve ark. (2003), *Bacillus polymyxiayaptıkları* çalışmalarda β -galaktosidazın 50 °C de stabil olduğu 60 °C den sonra stabilitesini korumadığını belirlemişlerdir. Ohtsu ve ark., (1998), *Thermus* sp. A4’ten elde edilen enzim 70 °C’de stabilitesini koruduğunu saptamışlardır.

β -galaktosidazın pH stabilitesinin belirlenmesi çalışmalarında VO2 izolatı pH 5.0, 6.0 ve 7.0’da 1 saat, pH 5.0 ve 6.0’da 2 saat sonundaki enzim aktivitesinin % 100 olduğu saptanmıştır. pH ve sürenin artmasıyla enzimin stabilitesini koruyamadığı, pH 10,0’da ve 12 saat sonundaki inkübasyon sonunda da enzim aktivitesini kısmen koruduğu belirlenmiştir.

VO9 izolatında enzimin pH 6,0’da 1 ve 2 saat inkübasyon sonunda enzimin stabil olduğu, pH ve sürenin artmasıyla enzim stabilitesini koruyamadığı gözlenmiştir. Buna göre her iki izolatın pH 6,0’da 1 ve 2 saat sonunda %100 oranında stabil olduğu tespit edilmiştir.

5.2.Öneriler

Bu çalışmada yeni izole edilen VO2 ve VO9 izolatlarının biyoteknolojide sıkça kullanılan enzimlerden olan β -galaktosidaz için uygun birer üretici olmaları ortaya konmuştur. İzolatlar enzimin hızlı ve ucuz bir şekilde elde edilmesinde elverişli biyolojik kaynaklar olarak değerlendirilebilir.

Günümüz biyoteknoloji enzimleri arasında önemli bir yere sahip olan β -galaktosidazın laktozu hidrolizi yönünden sağlık sektörü ve yiyecek endüstrisi için geliştirilerek daha kapsamlı sonuçlar ortaya çıkabilir.

Yapılan çalışmada KFF yöntemi ile pirinç ve mercimek kabuklarının β -galaktosidaz üretiminde alternatif substrat olarak kullanılabileceği tespit

edilmiştir. Bu atık maddelerin enzim eldesinde kullanımı hem ekonomik yönden hem de çevre kirliliğini önlemede büyük yararlar sağlayabilir. Ayrıca yeni izolatlardan KFF yöntemi kullanılarak çevreye duyarlı, ekonomik, verimliliği yüksek bir şekilde diğer biyoteknolojik enzimlerin eldesi sağlanabilir.

6.KAYNAKLAR

- Alazzeh, A.Y., Ibrahim, S.A., Song, D., Shahbazi, A., Abu Ghazaleh, A. A., 2009. Carbohydrate and Protein Sources Influence the Induction of α - and β -galactosidases in *Lactobacillus reuteri*, *Food Chemistry*, 117(4), 654-659
- Arda, M., 2000. Temel Mikrobiyoloji, *Medisan Yayın*, Ankara. 144-152.
- Atlas, R.M., Parks, L.C., Brown, A. E., 1995. Laboratory Manual of Experimental Microbiology, *Mosby-Year Book, St. Louis*, Missiori-43146: 565.
- Brena, B.M., Irazoqui G., Giacomini C., Batista-Viera F., 2002. Effect of Increasing Co-solvent Concentration on The Stability of Soluble and Immobilized β - Galactosidase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 757: 1-5.
- Boon M.A., Janssen A.E.M., Vant Riet K., 2000. Effect of Temperature and Enzyme Origin on the Enzymatic Synthesis of Oligosaccharides. *Enzyme and Microbial Technology*, 26: 271-281.
- Bury D., Geciova J., Jelen P., 2001. Effect of Yeast Extract Supplementation on β - Galactosidase Activity of *Lactobacillus delbrueckii sub sp. Bulgaricus* 11842 Grown in Whey, *Czech J.Food Sci.*, 19(5), 166–170.
- Cardoso, B., Silvério, Sara C., Abrunhosa, L., Teixeira, José A., Rodrigues, L., R., 2017. β -galactosidase from *Aspergillus lacticoffeatus*: A promising biocatalyst for the synthesis of novel prebiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 257: 67-74.
- Chakraborti, S., Sani, R. K., Banerjee, U.C., Sobti, R.C., 2003. Production and partial characterization of a novel β -galactosidase from a newly isolated *Bacillus polymyxa*. *Scientia Iranica*, 10(3), 279-286.
- Chakraborti, S., Sani, R.K., Banerjee, U.C., Sobti, R.C. 2000. Purification and characterization of a novel β -galactosidase from *Bacillus sp.* MTCC 3088. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 24: 58-63.
- Chang, B.S., Mahoney, R.R., 1989. Purification and thermostability of β -galactosidase (lactase) from *Research* an autolytic strain of

- Streptococcus salivarius* sub sp. *thermophilus*. *Journal of Dairy*, 56: 117-127.
- Dağbağlı, S. 2009. B-galaktosidaz enzim üretiminin optimizasyonu ve saflaştırılması. Doktora tezi. *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmir,192.
- Dandan, N., Xiaojing, T., Peace, M. N., Chao, J., Suren, S., xiaoguang, L., Bernard, A. P., Fuping, L., 2017. Biochemical characterization of three *Aspergillus niger* β -galactosidases. *Electronic Journal of Biotechnology* 27: 37-43.
- Duan, X., Hu, S., Qi, X., Gu, Z., Wu, J., 2016. Optimal extracellular production of recombinant *Bacillus circulans* β -galactosidase in *Escherichia coli* BL21(DE3). *Process Biochemistry*, 4: 17-24.
- Fan, Y., Hua, X., Zhang, Y., Feng, Y., Shen, Q., Dong, J., Zhao, W., Zhang, W., Jin, Z. and Yang, R. 2015. Cloning, expression and structural stability of a cold-adapted β -galactosidase from *Rahnella* sp. R3. *Protein Expression and Purification*, 115: 158-164.
- Garman, J., Coolbear, T., Smart, J., 1996. The effect of cations on the hydrolysis of lactose and the transferase reactions catalysed by β -galactosidase from six strains of lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 46: 22-37.
- Ghorbel, R. E. Maktouf, S., Massoud, E. B., Bejar, S. and Chaabouni, S. E., 2009. new thermostable amylase from *Bacillus cohnii*. US147 with a broad pH applicability. *Appl Biochem Biotechnol*, 157: 50-60.
- Godfrey, T., West, S., 1996. *Industrial Enzymology* 2nd. Ed., 329-341
- Gözükara, M.E. *Biyokimya*, 1997, *Nobel Tıp Kitabevleri*, Ankara.452-563
- Gül Güven, R. 2011. Termofilik bakteriler ve biyoteknolojik açıdan önemli bazı enzimleri.*Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi* TR, 9(1), 1-10.
- Gül Güven R., Güven K., Poli A., Nicolaus, B., 2007. Purification and some properties of a β -galactosidase from the thermoacidophilic *Alicyclobacillus acidocaldarius* subsp. *Rittmannii* isolated from Antarctica. *Enzyme and Microbial Technology*, 40: 1570-1577.

- Grosova, Z., Rosenberg, M., Rebros, M., 2008. Production of D-galactose using β -galactosidase and *Saccharomyces cerevisiae* entrapped in poly(vinylalcohol) hydrogel, *Czech. Food Sci.* 26: 1-14
- Huber, R.E., Kurz, G., Wallenfels, K., 1976. A quantitation of the factors which affect the hydrolase and transgalactosylase activities of beta-galactosidase (*E. coli*) on lactose. *Biochemistry*, 15(9), 1994-2001.
- Hudzicki, J., 2009. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Protocol. Retrieved from:<http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3189-kirbybauer-disk-diffusion-susceptibility-test-protocol>
- Hsu, C. A., Yu, R. C., Chou, C. C., 2006 Purification and characterization of a sodium-stimulated β -galactosidase from *Bifidobacterium longum* CCRC 15708, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22:355-361.
- Hsu, C.A., Yu R.C., Chou, C.C., 2005. Production of β -galactosidase by *Bifidobacteria* as influenced by various culture conditions, *International Journal of Food Microbiology*, 104: 197-206.
- Itoh, K., Toba, T., Itoh, T., Adachi S., 1993. Properties of β -galactosidase of *Lactobacillus kefirifaciens* K-1 isolated from kefir grains, *Letters in Applied Microbiology*, 15: 232-234.
- Kahyaoğlu, M., Kıvanç, M., 2007. Endüstriyel Atık Maddelerden Mikrobiyal Yolla Beta Karoten Üretimi, *Tarım Bilimleri Dergisi*. 17: 61-66.
- Karahan, A. G., Arıdoğan, B.C., Çakmakçı, L. 2002. “Genel Mikrobiyoloji”. Uygulama Kılavuzu. *Süleyman Demirel Üniversitesi Yayın* 24, 17-18.
- Khalid, A.A.R. and Byong, H. L., 1991. Specificity, Inhibitory Studies, and Oligosaccharide Formation by P-Galactosidase from Psychrotrophic *Bacillus subtilis* KL88, *J Dairy Sci*, 74: 1773 -1778.
- Konsula, Z., Liakopoulou-Kyriakides M., 2007 Co-Production α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates, *Bioresource Tecnology*, 98: 150-157.
- Kurt, A., 1996. Süt Teknolojisi, *Atatürk Üniversitesi Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümü yayınları*, Erzurum, 353

- Ladero, M., Santos, A., García, L.J. F., García-Ochoa, F., 2001 Activity over lactose and ONPG of a genetically engineered β -galactosidase from *Escherichia coli* in solution and immobilized, Kinetic modelling, *Enzyme and Microbial Technology*, 29: 181-193.
- Ladero, M., Ruiz, G., Pessela, B.C.C., Vian, A., Santos, A., García-Ochoa, F., 2006. Thermal and pH Inactivation of an Immobilized Thermostable β -galactosidase from *Thermus* sp strain T2: Comparison to the free Enzyme. *Biochemical Engineering Journal*, 31:14-24.
- Lartillot, S., 1993. "Immobilization of lactose on silica gel: study of lactose hydrolysis using the immobilized material." *Biochemical Education*. 21 (3), 157-159.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr A.L., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193: 265-275
- Panesar, P. S., Kumari, S. and Panesar, R., 2010. Potential applications of immobilized β -galactosidase in food processing industries, SAGE-Hindawi Access to Research, *Enzyme Research*, 2010: 1-16.
- Mahoney, R. R., 1998, Galactosyl-oligosaccharide Formation During Lactose Hydrolysis: A Review. *Food Chemistry*, 63(2), 147–154.
- Manan, M. A., Webb C., 2017. Modern microbial solid state fermentation technology for future biorefineries for the production of added-value products. *Biofuel Research Journal* 4: 730-740.
- Nagy, Z., Keresztess, Z., Szentirmai A., Biro S., 2001. Carbon source regulation of β - galactosidase biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*, *J. Basic Microbiol*, 41, 351-362.
- Neri, D.F.M., Balcao, V.M., Dourado, F.O.Q., Oliveria, J.M.B., Carvalho, L. B., Teixeira, J.A., 2009. Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on to a polysiloxane-polyvinil alcohol magnetic (mPOS-PVA) composite for lactose hydrolysis, *Reactive & Functional Polymers*, 69: 246-251.
- Ohtsu, N., Motoshima, H., Goto, K., Tsukasaki F., Matsuzawa, H. 1998. Thermostable β - galactosidase from an extreme thermophile, *Thermus*

- sp. A4: Enzyme purification and characterization and gene cloning and sequencing. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 62: 1539-1545.
- Onosakponome, I., 2017. Production, Partial Purification and Characterization of Cellulase by *Aspergillus niger* from Submerged Fermentation of Grape Bagasse.
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R., Nigam, P., 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes, *Current Science*, 77:149-162
- Pandey, A., 2003. Solid state fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, 13: 81-84
- Paulo, A. C., and Gubitz, G. M., 2003. Textile processing with enzymes. *CRC press, Cornwall, England*. ISBN 1 85573 610 1: 120-142
- Pivarnik, L.F., Senecal, A.G., Rand, A.G., 1995. Hydrolytic and Transgalactosylic Activities of Commercial β -Galactosidase (Lactase) in Food Processing. *Advances in Food and Nutrition Research*, 38: 1-102.
- Ramakrishnan, S., Venkataraman, R. 2008. Impact of herbal additives of lactose status of milk, *Rasayan J. Chem*, 1 (2), 204-206
- Sarıgül, N., 2007. Ege Bölgesi'ndeki çeşitli sıcak su kaynaklarından *Thermus* genusu İzolatların izolasyonu, moleküler yöntemlerle identifikasyonu ve β -galaktosidaz aktivitesinin saptanması. Doktora tezi *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmir. 344.
- Sara, C., Eugenia, A., Jose A. Teixeira, L. R. R., 2017. New β -galactosidase producers with potential for prebiotic synthesis. *Bioresource Technology*. 250:131-139
- Shaikh, F., Müllegger, J., He S., Withers, G. S., 2007 Identification of the catalytic nucleophile in Family 42 β -galactosidases by intermediate trapping and peptide mapping: YesZ from *Bacillus subtilis*, *FEBS Letters*, 581: 2441-2446.

- Shaikh, S.A., Khire, J.M., Khan, M.I., 1999. Characterization of a thermostable extracellular β -galactosidase from a thermophilic fungus *Rhizomucor sp.*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1472: 314-322.
- Shing, J., Batra, N., Banerjee, U.C., Patnaik, P.R., Sobti R.C., 2002. Production and characterization of a thermostable β -galactosidase from *Bacillus coagulans RCS3*, *Biotechnol. Appl. Biochem*, 36: 1- 6.
- Singhania, R.R., Patel, A.K., Soccol, C.R., Pandey, A., 2009. Recent advances in solid state fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, 44: 13-1.
- Song C., Guang-Lei L., Jin-Li Xu., Zhen-Ming C., 2010. Purification and characterization of extracellular β -galactosidase from the psychrotolerant yeast *Guehomyces pullulans 17-1* isolated from sea sediment in Antarctica, *Process Biochemistry*, 45, 954-960. .
- Sridevi, A., Nizamuddin, S., Narasimha, G., 2008. *Production of β -galactosidase by Aspergillus oryzae in solid state fermentation*, *African Journal of Biotechnology*, 7(8), 1096-1100
- Stryer, L., 1981 *Biochemistry (Stanford University) Second Edition*
- Tanyıldızı, M.Ş., Özer, D., Elibol, M., 2007. Production of bacterial α -amylase by *B. amyloliquefaciens* under solid state fermentation, *Biochemical Engineering Journal*, 37: 294-297.
- Tunç, G. 2006. Poli (metilmetakrilat-ko-glisidilmetakrilat) hidrojelini kullanarak β - galaktosidazın kovalent bağlanma yöntemiyle immobilizasyonu. Yüksek lisans tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü* Ankara. 78.
- Uhlig, H., 1998. *Industrial Enzymes and Their Applications*, Wiley, NewYork. 323-332.
- Ustok-Isık, F., Tari, C., Harsa, Ş., 2010. Biochemical and thermal properties of β - galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures, *Food Chemistry*, 119: 1114-1120.
- Vasiljevic, T., Jelen, P., 2001. Production of β -galactosidase for lactose hydrolysis in milk and dairy products using thermophilic lactic acid bacteria, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2: 75-85.

- Vesa, T.H., Marteau, P., Korpela, R., 2000 Lactose Intolerance, *Journal of the American College of Nutrition*, 19:165-175.
- Vetere, A., Paoletti, S., 2009. Separation and characterization of three β -galactosidases from *Bacillus circulans*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1380: 223-231.
- Weaver, R.F. 2004. Molecular Biology. University of Kansas – Lawrence. U.S.A
- White, A., Handler, P., Smith, E., Hill, R. L., Lehman, L.R., 1978. *Principles of Biochemistry*, 4: 760.
- www.drahmetdobrucali.com/hastaliklar/laktoz-intoleransi/, [Ziyaret Tarihi: 05 Mayıs 2017].
- Yazid, N.A., Barrena, R., Komilis, D., Sánchez, A., 2017. Solid-State Fermentation as a Novel Paradigm for Organic Waste Valorization. *Open Access Journal*, 9(2),1-28.
- Yin, H., Bultema, J.B., Dijkhuizen, L., Sander, S., Leeuwen, V., 2017 Reaction kinetics and galactooligosaccharide product profiles of the β -galactosidases from *Bacillus circulans*, *Kluyveromyces lactis* and *Aspergillus oryzae*, *Food Chemistry*. 225: 230-238.
- Zhou, Q.Z.K., Chen, X. D., 2001. Immobilization of β -Galactosidase on Graphite Surface by Glutaraldehyde. *Journal of Food Engineering*, 48: 69-74.



IKSAD

Publishing House



ISBN: 978-625-378-139-2